



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

AMANDA YOSHIZAKI

# EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NO INOTROPISMO MIOCÁRDICO DE RATOS IDOSOS



ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CARDIOLOGIA

2019

AMANDA PEREIRA YOSHIZAKI

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NO INOTROPISMO  
MIOCÁRDICO DE RATOS IDOSOS**

Dissertação de mestrado apresentada  
à Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências pelo programa de pós-  
graduação em Medicina-Cardiologia.

São Paulo  
Fevereiro 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA (CARDIOLOGIA)

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA DISFUNÇÃO  
INOTRÓPICA DO MIOCÁRDIO DE RATOS IDOSOS**

AMANDA PEREIRA YOSHIZAKI

Dissertação de mestrado apresentada  
à Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências pelo programa de pós-  
graduação em Medicina-Cardiologia.

São Paulo  
Fevereiro 2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,  
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Yoshizaki, Amanda Pereira

EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NO  
INOTROPISMO MIOCÁRDICO DE RATOS IDOSOS / Amanda Pereira  
Yoshizaki. - São Paulo, 2019.  
X, 40f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola  
Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-  
Graduação Stricto Sensu em Cardiologia.

Título em inglês: EFFECT OF AEROBIC PHYSICAL TRAINING IN  
THE MYOCARDIAL INOTROPISM OF ELDERLY RATS.

1. Exercício físico, Idosos, Disfunção cardíaca. 2. Contratilidade. 3.  
Inotropismo. 4. Cinética do cálcio. 5. Ratos.



## Abreviaturas

ADVE	Área diastólica do ventrículo esquerdo
ASVE	Área sistólica do ventrículo esquerdo
bpm	Batimentos por minuto
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CaCl	Cloreto de cálcio
CO <sup>2</sup>	Gás carbônico
cm/s	Centímetros por segundo
cm <sup>2</sup>	Centímetros cúbico
dP/dt	Primeira derivada temporal da pressão (positiva e negativa)
dT/dt	Primeira derivada temporal da tensão (positiva e negativa)
EF	Exercício físico
epm	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
MAF	Mudança na área funcional do ventrículo esquerdo
GAPDH	Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato
i.p.	Intraperitoneal
IS	Idoso sedentário
IT	Idoso treinado
JS	Jovem sedentário
KCl	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotasio
L-Ca <sup>2+</sup>	Canal de cálcio do tipo L
L <sub>máx</sub>	Limite de estiramento máximo (papilar)
mg/kg	Miligramas por quilo
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio

MI	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NCX	Trocador sódio-cálcio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
Onda A	Maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral
Onda E	Maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular esquerdo
PC	Peso corporal
PD <sub>2</sub> VE	Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PLB-Ser <sub>16</sub>	Fosfolamban fosforilada na serina 16
PLB-Thr <sub>17</sub>	Fosfolamban fosforilada na tirosina 17
PSVE	Pressão ventricular sistólica do ventrículo esquerdo
RAZAO E/A	Relação entre velocidade máxima da onda E, e velocidade máxima da onda A
RS	Retículo sarcoplasmático
RYR	Receptor de rianodina
SERCA2a	Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
TD	Tensão isométrica desenvolvida máxima
TFN	Treinamento físico de natação
TR	Tensão isométrica de repouso ou diastólica
VE	Ventrículo esquerdo
VO <sub>2</sub>	Consumo máximo de oxigênio
α-MHC	Cadeia pesada miosina (alpha)
β-MHC	Cadeia pesada miosina (beta)

## **DEDICATÓRIA**

A Deus Pai, responsável por tudo de bom em minha vida, que me dá forças e ilumina todos os dias, meus caminhos.

Aos meus pais, de amor incondicional, obrigada por existirem em minha vida! Às minhas irmãs Fernanda, Mariana e Juliana, meus filhos Beatriz, João Pedro e meu caçula Guilherme, pelo apoio, torcida, carinho e paciência... vocês foram fundamentais.

Ao Amor meu, companheiro, esposo, amigo, Ednei, pelo seu apoio, paciência e parceria sempre!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao querido professor e orientador Andrey Serra, por toda paciência e dedicação que tem tido comigo ao longo desses anos, desempenhar papel importante em minha vida acadêmica e por ser alguém em que eu posso me espelhar como ser humano e profissional.

Ao professor Paulo Tucci, exemplo de conduta, múltiplo saber, profissionalismo e postura no meio científico. Meu especial agradecimento pelo acolhimento em seu laboratório, paciência e apoio na realização deste trabalho.

Aos amigos, companheiros do Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca: Flavio Silva, Eduardo Santana, Marcos Koiti, Luis Felipe, Leslie Portes, Helenita Oliveira, Brunno Lemes, Stella Sousa, Fabíola Martin, Eduardo Veiga, Jairo Montemor, Mariana Santos, Danilo Bocalini, que fizeram parte da minha formação e continuarão presentes em minha vida.

Ao Laboratório de Genética Molecular do INCOR, pela colaboração neste trabalho, em especial Renato Crajoínas e Professora Adriana Girardi.

Ao programa de Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cardiologia, em especial ao secretário Carlos Eduardo (Kadú), professores Valdir Moisés e Francisco Fonseca.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto (processo CNPq Universal Nº 14/2012) sob coordenação do Prof. Dr. Andrey Jorge Serra.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudos.

## RESUMO

Os efeitos do treinamento físico na contratilidade do miocárdio envelhecido são investigados há décadas, mas os resultados disponíveis ainda estão inclusivos. Assim, esse estudo analisou se o treinamento físico de natação (TN) poderia melhorar o inotropismo miocárdico de ratos idosos. Os ratos, de linhagem Wistar, machos, com idade de 4 (jovens) e 21 meses (idosos), foram distribuídos em grupos jovens sedentários (JS), idosos sedentários (IS) ou idosos treinados (IT), com seis semanas de TN. O impacto do TN na aptidão cardiorrespiratória foi analisado por meio da determinação do consumo de oxigênio no pico do exercício, em teste de esforço conduzido em esteira rolante. Soma-se a determinação do tempo de nado em teste de esforço suportando a carga externa de 10% do peso corporal. Exames ecocardiográficos e hemodinâmicos foram empregados na avaliação da morfologia e função ventricular esquerda. O inotropismo miocárdico foi estudado em músculos papilares em regime de contração isométrica *in vitro*. Preparações histológicas de tecido miocárdico foram aplicadas na determinação do volume nuclear dos cardiomiócitos e do teor de colágeno. Western blot foi aplicado para analisar a expressão miocárdica de proteínas modulam a cinética do cálcio e a função da miosina. Ratos idosos não apresentaram disfunção cardíaca, mas o grupo idoso sedentário apresentou menor desempenho físico durante o teste de natação [JS:  $5 \pm 2$ ; IS:  $-16 \pm 0,4$ ; IT:  $51 \pm 3$ ; ( $\Delta\%$ ) segundos]. Além disso, o grupo IS mostrou pior inotropismo miocárdico, no qual foi revertido pelo TN (tensão máxima desenvolvida: JS:  $6,2 \pm 0,7$ ; IS:  $3,9 \pm 0,3$ ; IT:  $6,9 \pm 0,9$ ; g/mm<sup>2</sup>). O TN foi associado à preservação do aumento no teor de colágeno (JS:  $0,38 \pm 0,05$ ; IS:  $0,78 \pm 0,12$ ; IT:  $0,34 \pm 0,09$ ; %). O exercício atenuou parcialmente os efeitos do envelhecimento em proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> [canal de cálcio tipo L (L-Ca<sup>2+</sup>) e fosfolambam (PLB) por exemplo] e isoforma beta da miosina ( $\beta$ -MHC). Assim, propomos que essas alterações moleculares, juntamente com a inibição do aumento de colágeno, contribuam para a melhoria do desempenho miocárdico em ratos idosos submetidos ao TN.

## ABSTRACT

Exercise training effects on the contractility of aged myocardium have been investigated for more than 20 years, but the data are still unclear. This study evaluated the hypothesis that a swimming training (ST) may improve myocardial inotropism in older rats. Male Wistar rats aged 4 (young) and 21 (old) months-old were divided into young untrained (YNT), old untrained (ONT), and old trained (OTR; 6 weeks of ST) groups. Echocardiography and hemodynamic were employed to assess left ventricular morphology and function. Myocardial mechanics was evaluated on papillary muscles. Histological and immunoblotting were carried out to evaluate fibrosis and proteins that modulate the myocardial function and calcium handling. We found that older rats did not show cardiac dysfunction, but ONT group showed lower physical performance during a swimming test (YNT:  $5 \pm 2$ ; ONT:  $-16 \pm 0.4$ ; OTR:  $51 \pm 3$ ;  $\Delta\%$ , sec). Moreover, ONT group showed worse myocardial inotropism, in which it was reversed by ST (Peak developed tension: YNT:  $6.2 \pm 0.7$ ; ONT:  $3.9 \pm 0.3$ ; OTR:  $6.9 \pm 0.9$ ; g/mm<sup>2</sup>). The ST was associated with preserved collagen content (YNT:  $0.38 \pm 0.05$ ; ONT:  $0.78 \pm 0.12$ ; OTR:  $0.34 \pm 0.09$ ; %). Exercise partially mitigated the effects of aging on intracellular Ca<sup>2+</sup>-regulating protein (eg, L-Ca<sup>2+</sup> channel and phospholamban) and  $\beta$ -isoform of myosin. Thus, we propose that these molecular alterations together with inhibition of collagen increase contribute to improved myocardial performance in older rats.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Segmento do trabalho (desenho experimental)	7
<b>Figura 2</b>	Modelo da curva de tensão desenvolvida do músculo papilar.	11
<b>Figura 3</b>	Registro típico da força desenvolvida e derivada de força durante estiramento progressivo dos músculos papilares de 92 a 100% do $L_{\max}$ .	12
<b>Figura 4</b>	Imagem ilustrativa da resposta frente à pausa de estímulos elétricos.	12
<b>Figura 5</b>	Aptidão física dos grupos JS ( $n = 10$ ), IS ( $n = 9$ ) e IT ( $n = 10$ ) como resultado de 6 semanas de treinamento de natação ou período similar para ratos não-treinados.	15
<b>Figura 6</b>	Efeitos do treinamento de natação na massa cardíaca (JS, $n = 10$ ; IS, $n = 9$ ; IT, $n = 10$ ); peso do coração indexado pelo peso corporal e peso do ventrículo esquerdo indexado pelo peso corporal.	15
<b>Figura 7</b>	Efeitos do treinamento de natação no volume nuclear ( $n = 5$ por grupo) no VE	16
<b>Figura 8</b>	Efeitos do treinamento de natação no teor de colágeno do VE. ( $n = 5$ por grupo)	16
<b>Figura 9</b>	Desempenho miocárdico in vitro do músculo papilar avaliado em comprimentos correspondentes a 100% de $L_{\max}$ (JS, $n = 10$ ; IS, $n = 9$ ; IT, $n = 10$ ).	19
<b>Figura 10</b>	Expressão da proteína miocárdica avaliada por imunotransferência (JS, $n = 10$ ; IS, $n = 9$ ; IT, $n = 10$ ).	20
<b>Figura 11</b>	A expressão de proteínas das isoformas $\alpha$ -MHC e $\beta$ -MHC é mostrada em <b>A</b> e <b>B</b> , respectivamente. ( <b>C</b> ) $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC.	21

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Influência do envelhecimento e treinamento por natação, sobre morfologia do ventrículo esquerdo	17
<b>Tabela 2</b>	Influência do envelhecimento e treinamento por natação sobre a função do ventrículo esquerdo	18



## SUMÁRIO

	Lista de abreviaturas	
	Resumo	
	Abstract	
	Lista de figuras	
	Lista de tabelas	
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>6</b>
<b>3.1.</b>	Animais utilizados	6
<b>3.2.</b>	Desenho experimental	6
<b>3.3.</b>	Teste de capacidade aeróbia máxima durante o nado	7
<b>3.4.</b>	Teste de aptidão física aeróbio ( $VO_{2pico}$ )	7
<b>3.5.</b>	Protocolos de treinamento físico	8
<b>3.6.</b>	Ecocardiografia	8
<b>3.7.</b>	Hemodinâmica	9
<b>3.8.</b>	Contratilidade miocárdica “in vitro” - músculo papilar	10
<b>3.8.1.</b>	Curva de estiramento-tensão (Mecanismo de Frank-Starling)	11
<b>3.8.2.</b>	Resposta contrátil após pausa de estímulos (potenciação pós-pausa)	12
<b>3.9.</b>	Dados biométricos	12
<b>3.10.</b>	Estudo histopatológico	13
<b>3.11.</b>	Análise da expressão de proteínas no miocárdio	13
<b>3.11.1</b>	Preparação do tecido	13
<b>3.11.2</b>	Western-Blot	14
<b>3.12.</b>	Análise estatística	14

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>4.1.</b>	Treinamento por natação induz déficit de aptidão física em animais mais idosos	15
<b>4.2.</b>	Treinamento por natação induz hipertrofia miocárdica e previne fibrose	15
<b>4.3.</b>	Efeitos do treinamento de natação na morfologia e desempenho do VE	17
<b>4.4.</b>	Melhorias no treinamento por natação na mecânica miocárdica de animais idosos	18
<b>4.5.</b>	Treinamento por natação modula a expressão de proteínas de reabsorção de $\text{Ca}^{2+}$ e normaliza os interruptores de isoformas do miocárdio	20
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>22</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>29</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>30</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>38</b>
<b>8.1.</b>	Aprovação Comitê de ética	38
<b>8.2.</b>	Artigo publicado Journal of Gerontology	39

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial acima de 60 anos aumenta mais que outros grupos etários e, o aumento da longevidade, pode ser atribuído à melhora da qualidade de vida, aos avanços nos cuidados e promoções à saúde, ao diagnóstico precoce no tratamento de doenças e ao acesso à informação.

Acresça-se que a implantação de políticas governamentais para maximizar a saúde, a capacidade funcional das pessoas idosas e o desenvolvimento socioeconômico também cooperam para aumentar a população mundial de idosos (Who, 2012a). Há estimativas para o ano de 2050 que pontuam a possibilidade de que a população mundial idosa supere dois bilhões de pessoas (Who, 2012b).

O cenário nacional não diferi dos demais países a respeito do aumento da população idosa. Dados atuais ilustram que a população com idade acima de 60 anos supera 32 milhões (DATASUS, 2012). Não há objeções que esta condição caracterize situação favorável em termos de expectativa de vida, todavia, o aumento da longevidade também é acompanhado por incidência maior de doenças crônico-degenerativas. Assim, é apropriado mencionar que o processo de envelhecimento conduz a diminuição da reserva fisiológica global, conferindo maior vulnerabilidade a doenças (Freitas & Magalhães, 2011).

Entre as doenças crônico-degenerativas, anormalidades cardiovasculares possuem papel de destaque na população idosa (Lakatta & Levy, 2003), em que a idade avançada *'per se'* representa fator de risco (Pepe & Lakatta, 2005). Cooperam com esta informação diversas alterações fisiológicas em nível vascular e cardíaco que acometem idosos (Lakatta & Levy, 2003). A rede arterial vascular apresenta maior espessamento e rigidez parietal independente da presença de aterosclerose, em que o déficit na secreção de óxido nítrico e a deposição de  $\text{Ca}^{2+}$  são assinalados como fatores determinantes (Rodheuil et al., 2011). Esse cenário é propício para aumentar a pós-carga cardíaca, impondo dificuldade ao deságue ventricular (Lakatta & Levy, 2003; Chantler & Lakatta, 2012) e tem sido considerado como importante desencadeador de remodelamento cardíaco.

De particular interesse são as modificações estruturais e funcionais observadas no coração. Com o envelhecimento, há redução do número de cardiomiócitos e hipertrofia das células remanescentes. Em adição ao remodelamento celular, modificações na matriz extracelular, com aumento na

deposição de colágeno e fibrose intersticial também são passíveis de existir (Gerstenblith et al., 1977; Taylor & Starnes, 2003; Pepe & Lakatta, 2005).

De fato, mesmo comum ao processo de envelhecimento, o remodelamento cardíaco pode culminar em disfunção do órgão (Lakatta & Sollott, 2002) e constituir substrato para o desenvolvimento de futuras patologias. A literatura é razoavelmente concordante em ilustrar que, embora a ejeção ventricular esteja preservada, a função diastólica sofre prejuízo como resultado da complacência ventricular reduzida em idosos livres de doenças (Miller et al., 1986; Barmeyer et al., 2009; Karavidas et al., 2010).

Algo que desperta interesse reside na possibilidade do envelhecimento induzir modificações deletérias na mecânica miocárdica. Essa informação provém de estudos que empregaram preparações musculares isoladas e que o efeito prejudicial do envelhecimento na mecânica miocárdica foi claramente demonstrado (Capasso et al., 1983; Gwathmey et al., 1990; Kiriazis & Gibbs, 2001). Toma-se como exemplo o estudo de Grand & Howlett (2006), em que os autores trabalharam com cardiomiócitos isolados de ratos e observaram velocidade de encurtamento celular reduzida. Em outro estudo conduzido em macacos, a redução da contratilidade miocárdica associada ao envelhecimento também foi evidente (Takagi et al., 2003).

Apesar de pouco compreendidos, certos fatores podem ser responsabilizados por reduzirem o desempenho inotrópico do miocárdico. Menciona-se decréscimo do número de cardiomiócitos viáveis, aumento na deposição de colágeno intersticial, alterações no potencial de ação e inadequado transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular decorrente de modificações no conteúdo e atividade de proteínas envolvidas na cinética do cálcio e na sinalização de receptores acoplados a proteína G (Anversa et al., 1986; Pugh & Wei, 2001; Heckman, 2008; Grandy & Howlett, 2006; Leosco et al., 2007).

As circunstâncias acima mencionadas caracterizam a necessidade de intervenções que previnam ou atenuem as mudanças estruturais, funcionais e moleculares cardíacas despertadas pelo envelhecimento. Além disso, ao considerar fundamental a manutenção da capacidade contrátil do miocárdico para homeostasia do desempenho cardíaco, é concebível que a adoção de medidas que preservem o inotropismo sejam fortemente recomendadas.

O exercício físico (EF) é amplamente aceito como terapia não farmacológica para promoção de saúde, melhoria da qualidade de vida, prevenção e controle de diversas doenças cardiovasculares (Pate et al., 1995; Abete et al., 2010; Rica et al., 2012; Floegel et al., 2016). Assim, não é insensato pensar que os benefícios do EF também possam estar presentes no processo de envelhecimento. Nessa perspectiva, nosso grupo tem mostrado que diferentes modalidades de EF aeróbios induzem significativa melhora da capacidade cardiovascular em idosos (Bocalini et al., 2008). Depreende-se que o benefício despertado pelo EF derive de modificações nas propriedades funcionais cardíacas. Consoante a esta ideia, diferentes programas de EF aeróbio foram eficientes em promover atenuação da disfunção diastólica (Prasad et al., 2007) e aprimoramento do desempenho sistólico ventricular (Fujimoto et al., 2010).

De interesse são os possíveis efeitos do EF nas propriedades funcionais intrínsecas do miocárdio. Nesse campo de investigação há estudos que demonstram resultados relevantes, em que animais idosos submetidos à EF aeróbio apresentaram aumento na contratilidade miocárdica (Lakatta & Spurgeon, 1987; Tate et al., 1990). Quando o objetivo é determinar os possíveis mecanismos envolvidos no aprimoramento da mecânica miocárdica, a atenuação no teor de colágeno (Thomas et al., 1992; Maifrino et al., 2009), o aumento da angiogênese (Iemitsu et al., 2006), a melhor responsividade beta-adrenérgica (Leosco et al., 2007) e o aumento no conteúdo de proteínas envolvidas na cinética do  $\text{Ca}^{2+}$  (Iemitsu et al., 2004) têm sido documentados.

Os resultados acima estimulam a aceitar que o EF melhora o inotropismo do miocárdio envelhecido. Todavia, há dados na literatura que não ilustram qualquer efeito positivo (Li et al., 1986; Wei et al., 1989; Taffet et al., 1996), o que dificulta a tomada de decisão definitiva sobre o assunto. Dessa maneira, a ausência de modificações positivas na tensão desenvolvida e, respectivas derivadas de tensão (indicadores clássicos de função miocárdica), em preparações de músculos contraindo isoladamente não permitem advogar a favor de melhora contrátil do miocárdio envelhecido despertada pelo EF. Esses efeitos inconsistentes do EF pautaram a proposta deste estudo — avaliar se o treinamento físico de natação (TFN) poderia melhorar o inotropismo miocárdico. Outra questão de mérito consiste no fato de estudos anteriores analisarem a repercussão do EF em esteira, em que o

papel do TFN ainda é incerto. Para explorar potenciais mecanismos participantes da melhora no inotropismo miocárdico, a expressão de proteínas chaves na regulação da cinética do  $\text{Ca}^{2+}$  e função sarcomérica foram investigadas.



## **2. OBJETIVOS**

- Avaliar se o TFN atenua o remodelamento cardíaco e disfunção inotrópica do miocárdio de ratos idosos;
- Analisar os mecanismos moleculares envolvidos na melhora do inotropismo miocárdico.



### 3. MÉTODO

#### 3.1. Animais

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíacas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)- Escola Paulista de Medicina. Os procedimentos experimentais foram realizados em acordo com o “manual sobre cuidados e uso de animais de laboratório” (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals- National Research Council, NIH Publication Nº 85-23, revised 1996*) e “princípios de cuidados com animais de laboratório” (*Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research, 2003*). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UNIFESP (CEUA nº 1673020414).

Ratos Wistar machos, pesando entre 220 e 450 gramas, foram confinados em caixas plásticas em ambiente com temperatura controlada (~22° C), ciclo de 12 horas claro/escuro e alimentados com água e ração *ad libitum* (Nuvilab). Os animais foram distribuídos em um dos seguintes grupos experimentais:

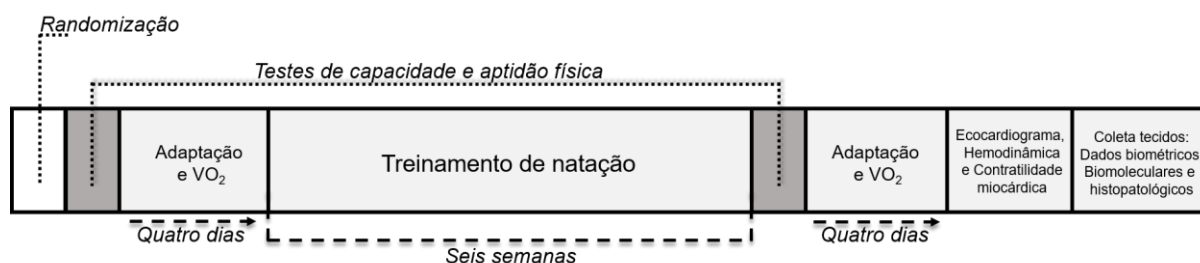
- Grupo Jovem Sedentário (**JS** n= 10): ratos com quatro meses de idade que permaneceram não treinados ao longo do estudo;
- Grupo Idoso Sedentário (**IS** n= 9): ratos com 22 meses de idade que permaneceram não treinados ao longo do estudo;
- Grupo Idoso Treinado (**IT** n= 10): ratos com 22 meses de idade que foram submetidos ao programa de treinamento físico em piscina.

#### 3.2. Desenho experimental

Como ilustrado na Figura 1, a primeira fase do estudo consistiu em distribuir aleatoriamente os animais idosos em grupo experimental não treinado ou treinado. Em seguida, os animais foram submetidos a testes de esforço físico em piscina e esteira rolante, respectivamente, antes e após o período de TFN de seis semanas e, em seguimento correspondente para os animais que permaneceram não treinados. O teste de esforço em esteira foi conduzido quatro dias após análise do desempenho físico em piscina. No dia seguinte ao último teste de esforço, os animais foram anestesiados e submetidos a análise ecocardiográfica. Após 48 horas do último teste físico, os animais foram anestesiados e submetidos a análise ecocardiográfica. No dia seguinte, sob novo regime anestésico, os animais foram



submetidos a estudo da função ventricular esquerda por cateterismo e, em seguida, sacrificados para avaliação da contratilidade miocárdica “*in vitro*” e coleta de material biológico para estudo histológico e molecular.



**Figura 1.** Segmento do trabalho (desenho experimental). VO<sub>2</sub>, corresponde a aplicação de teste de esforço em esteira com monitoramento do consumo de oxigênio.

### 3.3. Aptidão física aeróbia em piscina

Para caracterizar a capacidade aeróbia máxima em piscina, os animais foram submetidos a protocolo de esforço previamente publicado pelo nosso grupo (Bocalini et al., 2010). Assim, os ratos nadaram suportando a carga de 10% de sua massa corporal total até o ponto de exaustão. A exaustão foi definida quando os animais permanecessem imersos por 10 segundos.

### 3.4. Aptidão física aeróbia em esteira

A aptidão cardiorrespiratória foi analisada por meio do consumo de oxigênio no pico de esforço (VO<sub>2pico</sub>), com os ratos correndo em esteira rolante equipada com analisador de gases (Panlab-Harvard-Apparatus Treadmill, Harvard Bioscience Company, Massachusetts, EUA). O sistema foi calibrado com concentrações conhecidas de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> antes da realização de cada teste. O protocolo de teste seguiu as orientações da sociedade americana de fisiologia (Thomas et al., 2001; Kregel, 2006) e foi realizado como previamente descrito em nosso laboratório (Amadio et al., 2015; Guaraldo et al., 2016; de Melo et al., 2016; de Souza-Vieira et al., 2019). Todos os animais foram submetidos a três dias de familiarização com o exercício em esteira durante 15 minutos, divididos em três estágios de cinco minutos cada: primeiro dia (25cm/s, 35cm/s, 35cm/s); segundo dia (25 cm/s, 45 min/s, 55 cm/s); e terceiro dia (25 cm/s, 55 min/s, 65 cm/s). Após 24 horas do último dia de familiarização, os animais foram pesados e seus dados registrados em *software* fornecido pelo fabricante. O protocolo de teste foi contínuo

e progressivo, com velocidade inicial de 25 cm/s e inclinação de 0°. A intensidade do exercício em esteira foi aumentada por meio da velocidade. A velocidade da esteira foi aumentada em 9 cm/s a cada dois minutos, até que o animal fosse incapaz de caminhar ou correr a despeito da estimulação elétrica (Kregel, 2006). O primeiro minuto de cada estágio destinou-se à análise das frações inspiradas de O<sub>2</sub> (FiO<sub>2</sub>) e CO<sub>2</sub> (FiCO<sub>2</sub>) e o segundo minuto à análise das frações expiradas de O<sub>2</sub> (FeO<sub>2</sub>) e de CO<sub>2</sub> (FeCO<sub>2</sub>).

### **3.5. Protocolos de treinamento físico**

Os animais nadaram em piscina, sem carga de trabalho fixada a cauda, conforme protocolo utilizado por nosso grupo (Portes et al., 2009; Bocalini et al., 2010; Veiga et al., 2011; Veiga et al., 2012, Santos et al., 2016). O programa de treinamento foi dividido em duas fases:

- Fase 1 (adaptação), com duração total de seis dias. No primeiro dia, os animais foram deixados nadando em piscina durante 10 minutos e, em dias subsequentes, cada sessão de exercício foi acrescida em 10 minutos. Ao final do período de adaptação, os animais nadaram 60 minutos consecutivos por sessão;
- Fase 2 (treinamento principal), em que os animais nadaram 60 minutos por dia, cinco vezes por semana, até totalizar seis semanas de treinamento. A água da piscina foi constantemente agitada com auxílio de uma bomba de fluxo para evitar que os animais mergulhassem ou boiassem ao longo das sessões de treinamento. Todavia, em acordo com recomendações para prescrição de exercícios para roedores (Kregel et al., 2006), os animais que assumiram tal comportamento na fase adaptativa (fase I) foram excluídos do estudo.

### **3.6. Ecocardiografia**

Os animais foram anestesiados (i.p.) com mistura de cetamina (50 mg/kg) com xilazina (10 mg/kg) antes do primeiro e 48 horas após o último teste de esforço e imagens ecocardiográficas foram obtidas usando transdutor de 12 MHz conectado a um equipamento HP Sonos-5500 (Hewlett- Packard, CA, EUA). O dispositivo possibilita a obtenção de imagens cardíacas em tempo real nos modos mono e bidimensional e velocidade de fluxo por efeito Doppler espectral. Para tal, após tricotomia da face anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito

lateral esquerdo e três eletrodos colocados nas patas para obtenção do traçado eletrocardiográfico simultâneo à imagem ecocardiográfica. Imagens em cortes transversais do ventrículo esquerdo (VE) foram gravadas em fitas de vídeo para análise posterior. Foram utilizadas as janelas paraesternal esquerda (corte longitudinal e transversal) e apical (quatro câmaras e duas câmaras). Realizamos como medidas de análise em modo-M do VE: diâmetro diastólico (DdVE) e sistólico (DsVE) finais. A função sistólica foi avaliada por determinação da fração de encurtamento (FEn), calculada com a equação:  $FEn = (DdVE - DsVE / DdVE) \times 100$ . A função diastólica foi analisada por meio dos índices derivados da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral obtido por Doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras, posicionando-se a amostragem de volume próximo à face ventricular da valva mitral. Procedeu-se com determinação: a) Onda E: maior valor da velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular; b) Onda A: maior valor da velocidade de fluxo telediastólico mitral; c) Relação E/A: razão entre a velocidade máxima das ondas E e A.

### 3.7. Hemodinâmica

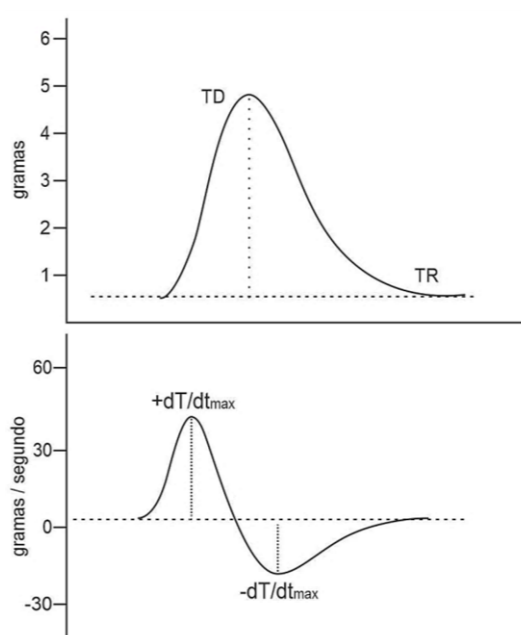
Vinte e quatro horas após o estudo ecocardiográfico, os ratos foram anestesiados com Uretana (1,2 g/kg, *i.p.*, Sigma, MO, USA), os animais foram mantidos aquecidos com unidade de controle de temperatura HB 101/2 (LETICA Scientific Instruments, Cornella, Espanha) a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  e ventilados mecanicamente com dispositivo para roedores Hugo Basile modelo 7025 (Biological Research Apparatus, Comélio, Itália) com frequência de 100 movimentos/minuto e volume corrente de 10 ml/kg, enriquecida com oxigênio (aproximadamente 0,2 ml). Um micromanômetro Millar (MikroTip® 2F, Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA) acoplado ao sistema de aquisição de dados AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, USA) teve sua extremidade distal posicionada dentro da cavidade do VE a partir de cateterismo da carótida comum direita para obtenção da pressão intracavitária (Serra et al., 2010; da Silva et al. 2013; Giampá et al. 2016; Lemes et al. 2016; de Salvi-Guimarães et al. 2017). Foram avaliados além das pressões sistólica e diastólica do VE, as primeiras derivadas temporais de pressão (positiva e negativa) e a frequência cardíaca.

### 3.8. Contratilidade miocárdica “*in vitro*” de músculos papilares

Na sequência da avaliação hemodinâmica, os animais receberam suplementação anestésica de Uretana (400 mg/ml, 500 µl, i.v.) e, sob regime anestésico patente, o coração foi retirado rapidamente do tórax e mergulhado em solução de Krebs-Henseleit pré-aquecida a 28°C e oxigenada com O<sub>2</sub> 100%. A parede do ventrículo direito (VD) foi isolada para expor o septo interventricular. O septo foi seccionado ao meio para expor os músculos papilares. O músculo papilar posterior foi cuidadosamente dissecado em plataforma de parafina e suas extremidades tendínea e parietal foram fixadas a anéis de aço inoxidável. Então, o músculo papilar foi suspenso verticalmente em cuba de vidro preenchida com 5 ml de solução de Krebs-Henseleit. A extremidade tendínea superior foi conectada por anel e fio de aço inoxidável de 0,35 mm de diâmetro a um transdutor de força (GRASS FT-03, Astro-Med, Inc., RI, USA) e o anel da extremidade inferior conectado a um gancho fixo na cuba de vidro. O transdutor de força foi acoplado ao micromanipulador (Nº 2046F, Mitutoyo Inc, Kawasaki, Japan) que possibilitou deslocamento vertical a cada 10 micrômetros/volta. A solução de Krebs-Henseleit foi composta, em milimoles por litro, por: 138 NaCl; 4,6 KCl; 1,5 CaCl; 1,15 MgSO<sub>4</sub>; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,5 glicose e 20 de HEPES como tampão. O pH foi ajustado para 7,4 ± 0,05 adicionando-se hidróxido de sódio (NaOH) em concentração de 20%. A solução foi oxigenada com 100% de O<sub>2</sub> e pressão parcial mantida acima de 550 mmHg. O transdutor conectado ao microcomputador dotado do software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, USA) permitiu determinar os valores das variáveis fisiológicas analisadas. Paralelamente ao músculo papilar foram posicionados dois eletrodos de platina acoplados a estimulador elétrico (DV&M, modelo ESF-10) que emitiram estímulos em onda quadrada de 5 ms, com voltagem aproximadamente 10% maior que o mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo, o que geralmente correspondeu a 7 V. Todos os músculos foram estimulados com frequência de 0,2 Hz.

Durante 45 minutos, o músculo foi mantido em contração isométrica contra pré-carga baixa por meio de molas metálicas (tensão nominal de 0,3 g) colocadas entre o anel superior e o transdutor. Em seguida, o músculo foi colocado em contrações isométricas sem as molas e, com o auxílio do micromanipulador, foi cuidadosamente estirado até a tensão de repouso atingir 0,4 g e mantido nestas

condições por 20 minutos. Após estabilização, foram feitos sucessivos estiramentos de 5  $\mu\text{m}$  cada, até atingir o ápice da curva comprimento versus tensão desenvolvida e, então, determinado seu  $L_{\text{max}}$  (comprimento diastólico da fibra muscular associado à máxima tensão isométrica desenvolvida) e medido o seu comprimento com auxílio de paquímetro (Mitutoyo Inc., Kawasaki, Japão). Enfim, o músculo foi deixado em  $L_{\text{max}}$ , permanecendo em contração isométrica estável por cerca de 45 minutos antes do início das manobras experimentais para determinação dos seguintes parâmetros funcionais:



**TD:** tensão desenvolvida máxima;

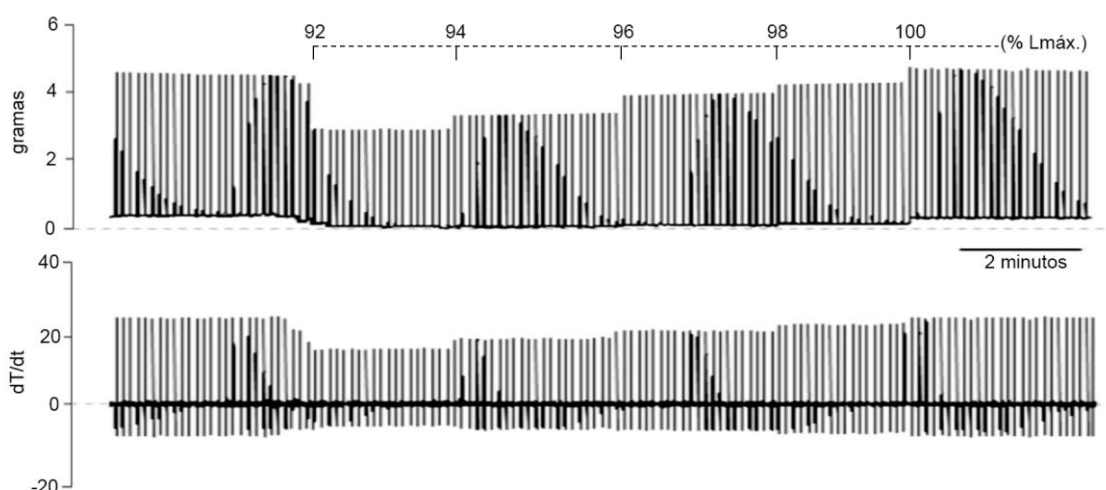
**TR:** tensão de repouso ou diastólica;

**dT/dt:** Taxa de variação da tensão desenvolvida por unidade de tempo, sendo obtidas as máximas derivadas positiva (+dT/dt máx) e negativa (-dT/dt máx), que informam a variação temporal da força na contração (sístole) e relaxamento (diástole), respectivamente.

**Figura 2.** Curva de tensão desenvolvida do músculo papilar.

### 3.8.1. Curva de estiramento-tensão (mecanismo de Frank-Starling).

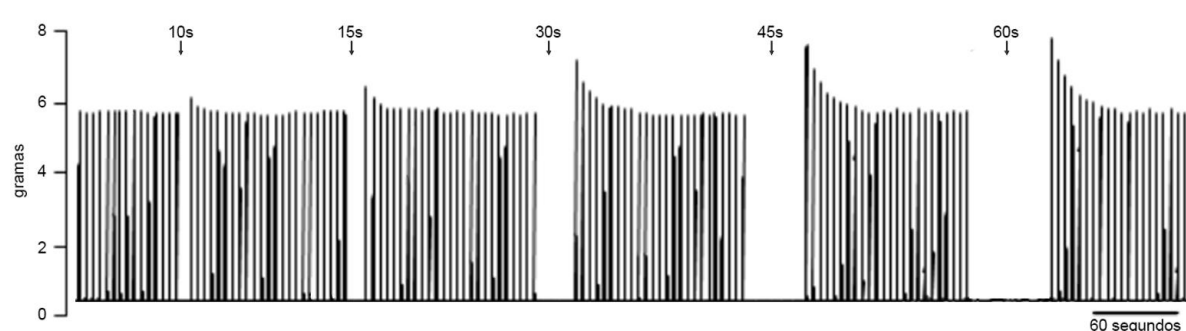
Após nova estabilização isométrica em  $L_{\text{max}}$ , os músculos foram avaliados em regime de comprimentos correspondentes a 92%, 94%, 96%, 98% e 100% do  $L_{\text{max}}$ , possibilitando a determinação, *a posteriori*, da relação entre estiramento e TD (relação de Frank-Starling). A Figura 3 ilustra o experimento típico para análise de Frank-Starling.



**Figura 3.** Registro típico da força desenvolvida e derivada de força durante estiramento progressivo dos músculos papilares de 92 a 100% do  $L_{max}$ .

### 3.8.2. Potenciação pós-pausa

Períodos crescentes de pausa (10, 15, 30, 45 e 60 segundos) do estímulo elétrico foram empregados para determinar a magnitude do inotropismo miocárdio frente à pausa de estímulos (Bocalini, 2012; dos Santos, 2013). Como ilustrado na Figura 4, considerou-se o valor relativo às contrações que precediam a pausa, aguardando-se o retorno da contração para as condições basais entre os testes de pausa de estímulo.



**Figura 4.** Imagem ilustrativa da resposta inotrópica frente à pausa de estímulos elétricos.

## 3.9. Dados biométricos

Logo após a remoção do coração e retirada dos músculos papilares, os átrios e vasos da base foram excisados e os ventrículos (direito e esquerdo) foram rapidamente pesados para a avaliação das massas miocárdicas brutas e corrigidas pelas massas corpóreas dos animais.

### 3.10. Estudo histopatológico

Após pesagem do VE, parte da estrutura (fatia basal da cavidade) foi imersa em formol 10% tamponado com solução-tampão fosfato (0,01 mM; pH 7,4) para obtenção dos cortes para estudo em microscopia de luz. Os fragmentos de tecidos foram dispostos em cassetes plásticos do tipo processador/incluser e processados em aparelho autotécnico com ciclo total de 12 horas para a desidratação, diafanização e parafinização do material. A desidratação foi realizada com concentrações crescentes de álcool etílico até chegar ao álcool absoluto, diafanizados em Xilol, impregnados e incluídos em parafina a 60°C para obtenção de cortes de 7 µm em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035). A seguir, os cortes foram colocados em lâminas mantidas a 37°C para secagem, colagem e posterior coloração com “Hematoxilina-Eosina” e “Picrosirius red”. As imagens microscópicas foram visualizadas em microscópio Leica DM/LS (Leica Microsystems Ltd, Germany) ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Solutions). As imagens digitalizadas foram analisadas com *software* específico (Leica QWin Plus V.3.2.0., Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) para determinação do volume nuclear dos cardiomiócitos e teor de colágeno intersticial conforme previamente descrito (Serra et al., 2008; Manchini et al., 2017).

### 3.11. Expressão de proteínas no miocárdio

#### 3.11.1. Preparação da amostra

Após pesagem, o VE remanescente à retirada do músculo papilar foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido. Os tecidos foram homogeneizados em 10 mL de tampão de lise gelada composta por Tris-HCl (10 mM), EDTA (1mM), EGTA (1mM), aprotinina (1 µg/ml), leupeptina (1 µg/ml), pepstatina A (1 µg/ml), inibidor da calpaína I (8 µg/ml), inibidor da calpaína II (8 µg/ml) e fenilmetilsulfonil fluoreto (0,5 mM). O homogenato foi centrifugado a 2000 g (48°C) por 10 minutos e o sobrenadante foi centrifugado a 10000 g (48°C) por 60 minutos. O resíduo foi ressuspensionado em tampão gelado contendo inibidores de proteases (Sigma Chemical Corp., St Louis, MO, USA) (Manchini et al., 2014). O conteúdo de proteína total foi determinado pelo método de Lowry.

### 3.11.2. Western blot

Amostras de proteínas (~ 30 µm) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (8 ou 12%, BioRad gel, EUA). Após separação, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-P, Amersham Biosciences; Piscataway, NJ, EUA). A eficiência da transferência e a igualdade da carga de proteínas foram verificadas com Ponceau S. As membranas foram bloqueadas em TBST (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) contendo leite em pó desnatado (5%). As proteínas transferidas foram incubadas com anticorpos primários para trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (anti-NCX canina; 1:200, Swant), canal de cálcio tipo L (anti- $\text{LCa}^{2+}$ ; 1:200, Abcam), receptor de rianodina (anti-Ryr camundongo; 1:400, Abcam), retículo sarcoplasmático (anti-SERCA2a canina; 1:200, Affinity BioReagents), fosfolambam (anti-PLB cabra; 1:400, Santa Cruz), fosforilada na treonina 17 (anti-PLB-Thr<sub>17</sub> cabra; 1:4000, Abcam), fosfolambam fosforilada na serina 16 (anti-PLB-Ser<sub>16</sub> cabra; 1:400, Abcam), cadeia pesada beta da miosina (anti- $\beta\text{MHC}$ ; 1:100 camundongo, Sigma Aldrich), cadeia pesada alfa da miosina (anti- $\alpha\text{MHC}$ ; 1:100 camundongo, Sigma Aldrich) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (anti-GAPDH; 1:2000 cabra, Abcam) por 12 horas a 48°C. Após lavagem com TBST, as membranas foram expostas aos anticorpos secundários, detectados com reagentes de quimiluminescência (ECL, Amersham, EUA). Marcadores de peso molecular (Amersham) foram usados para identificar as proteínas. A expressão proteica foi determinada após digitalização das membranas e a densidade óptica das proteínas foi analisada com o *software* Image J.

### 3.12. Análise estatística

Os dados foram analisados com o *software* GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA). A normalidade dos dados foi examinada com o teste de Shapiro-Wilk. A ANOVA uma ou duas vias (*post hoc*: Newman-Keuls ou Bonferroni) foi aplicada para detectar diferenças entre grupos que exibiram distribuição Gaussiana dos dados. Kruskal-Wallis (*post hoc* de Dunn) foi aplicado a dados sem distribuição normal. O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ . Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

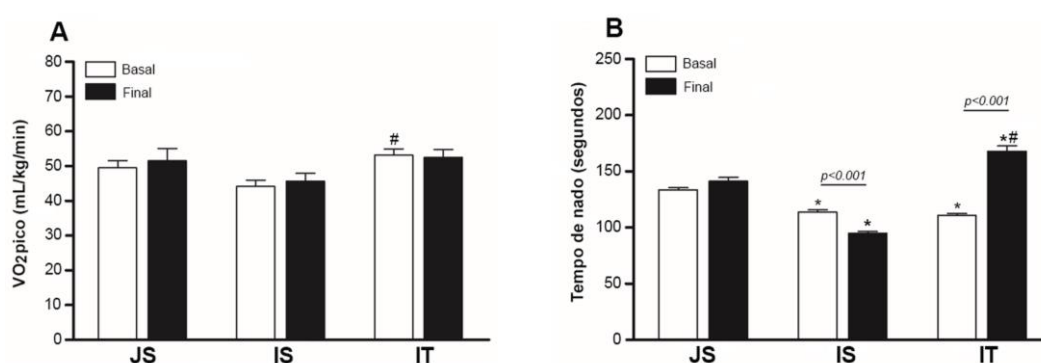




## 4. RESULTADOS

### 4.1. Natação aumenta aptidão física aeróbia de ratos idosos

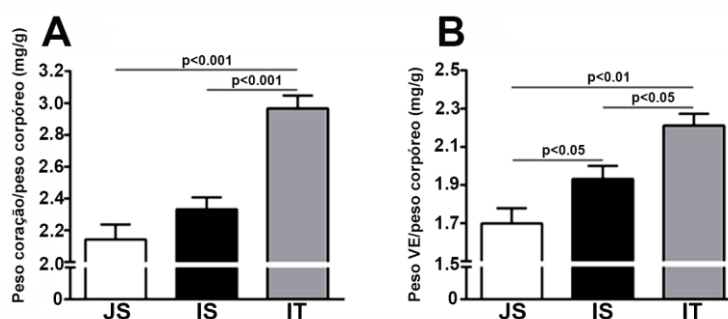
A Figura 5A ilustra dados da aptidão física determinada em esteira rolante, utilizando o  $VO_{2pico}$  como marcador. Nós não observamos modificação significativa no  $VO_{2pico}$  durante o segmento de estudo nos animais jovens e idosos não treinados, circunstância que não foi afetada pelo treinamento físico. Ao aplicar o teste de esforço em piscina (Figura 5B), os animais idosos não treinados exibiram redução significativa da resistência aeróbia. Todavia, o treinamento resultou em melhoria significativa do desempenho físico.



**Figura 5.** Aptidão física aeróbia dos grupos JS ( $n = 10$ ), IS ( $n = 9$ ) e IT ( $n = 10$ ) como resultado de seis semanas de treinamento de natação ou período similar para ratos não-treinados. **(A)** Consumo de oxigênio de pico ( $VO_{2pico}$ ). **(B)** Teste de natação. ANOVA duas vias seguida de teste de comparação múltipla de Bonferroni foram aplicados nas comparações. <sup>\*</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo JS para o respectivo tempo; <sup>#</sup> $p < 0,05$  comparado ao grupo IS. JS, jovem sedentários; IS, idoso sedentário; IT, idoso treinado.

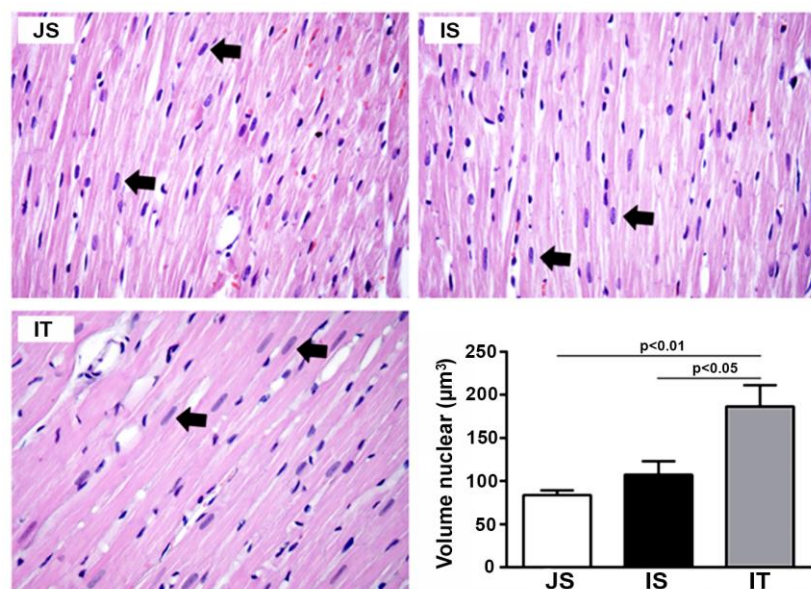
### 4.2. Natação induz hipertrofia miocárdica e previne fibrose

Os ratos do grupo IS exibiram maior razão peso cardíaca e VE/peso corporal em comparação com ratos do grupo JS. Os animais treinados exibiram efeito adicional sobre a massa miocárdica (Figura 6 A e B).



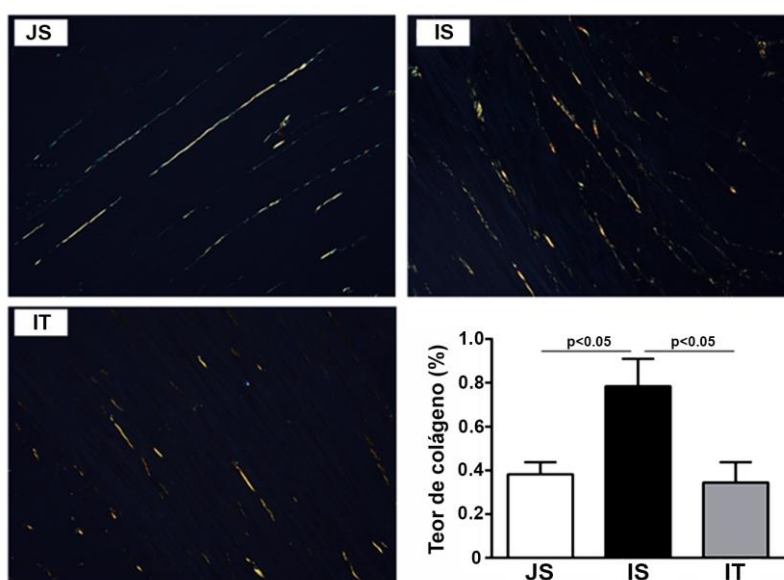
**Figura 6.** Efeitos do treinamento de natação na massa cardíaca (JS,  $n = 10$ ; IS,  $n = 9$ ; IT,  $n = 10$ ). **(A)** Peso do coração indexado pelo peso corporal. **(B)** peso do ventrículo esquerdo indexado pelo peso corporal. JS, jovem sedentários ( $n = 10$ ); IS, idoso sedentário ( $n = 9$ ); IT, idoso treinado ( $n = 10$ ). ANOVA uma via e pós-teste de Newman-Keuls foram aplicados para detectar diferenças entre os grupos.

A hipertrofia miocárdica induzida pelo TFN foi confirmada pelos achados de volume nuclear dos cardiomiócitos (Figura 7).



**Figura 7.** Microfotografias representativas do volume nuclear ( $n = 5$  por grupo) no VE (ampliação de 40x, barra de escala: 250  $\mu\text{m}$ ). ANOVA uma via e pós-teste de Newman-Keuls foram aplicados para detectar diferenças entre os grupos. O nível de significância para as comparações está representado acima das barras. JS, jovem sedentários; IS, idoso sedentário; IT, idoso treinado.

Ratos idosos exibiram maior teor de colágeno no miocárdica, circunstância que foi abolida com o treinamento físico (Figura 8).



**Figura 8.** Microfotografias representativas do colágeno ( $n = 5$  por grupo) no VE (ampliação de 40x, barra de escala: 250  $\mu\text{m}$ ). ANOVA uma via e pós-teste de Newman-Keuls foram aplicados para detectar diferenças entre os grupos. O nível de significância para as comparações está representado acima das barras. JS, jovem sedentários; IS, idoso sedentário; IT, idoso treinado.

### 4.3. Efeitos do TFN na morfologia e desempenho do VE

O peso corporal foi semelhante entre os grupos experimentais ao final do estudo, com circunstância similar para a maioria das variáveis morfofuncionais do VE obtidas por análise ecocardiográfica (Tabela 1). A única alteração significativa documentada foi para a área sistólica do VE absoluta e indexada pelo peso corporal, que diferiu do grupo JS para o JS.

**Tabela 1.** Análise ecocardiográfica da morfologia e função do ventrículo esquerdo (VE).

	<b>JS</b> <b>(n=10)</b>	<b>IS</b> <b>(n=9)</b>	<b>IT</b> <b>(n=10)</b>
<b>PC (g)</b>	391 ± 13	415 ± 27	427 ± 22
<b>FC (bpm)</b>	255 ± 12	247 ± 19	240 ± 20
<b>ADVE (cm<sup>2</sup>)</b>	0,49 ± 0,002	0,55 ± 0,02	0,51 ± 0,02
<b>ADVE/PC (cm<sup>2</sup>/g)</b>	0,0012 ± 0,0006	0,0013 ± 0,0006	0,0012 ± 0,0009
<b>ASVE (cm<sup>2</sup>)</b>	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,01*	0,15 ± 0,01
<b>ASVE/PC (cm<sup>2</sup>/g)</b>	0.00030 ± 0.00003	0.00042 ± 0.00002*	0.00035 ± 0.00003
<b>MAF</b>	75 ± 1	68 ± 2	70 ± 3
<b>Onda E</b>	0,64 ± 0,04	0,53 ± 0,03	0,62 ± 0,03
<b>Onda A</b>	0,35 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,01
<b>Razão E/A</b>	1,84 ± 0,12	1,8 ± 0,17	1,81 ± 0,13

Análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo (VE) no final do estudo. JS, jovem sedentário; IS, idoso sedentário; IT, idoso treinado; PC, peso corporal; FC, frequência cardíaca; ADVE, área diastólica do VE; ASVE, área sistólica do VE; MAF, mudança na área fracional do VE; Onda E, velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular; Onda A, velocidade de fluxo telediastólico mitral; Razão E/A, relação entre as ondas E e A. Os dados foram analisados com ANOVA uma via e pós-teste Newman-Keuls. \*p<0,05 comparado ao grupo JS.

O estudo hemodinâmico do VE também não ilustrou modificações funcionais expressivas entre os grupos experimentais (Tabela 2). De fato, houve apenas

alteração discreta da pressão diastólica final do VE ( $PD_2$ ), que foi significativamente maior nos ratos idosos em comparação ao grupo jovem. O TFN não afetou a  $PD_2$ .

**Tabela 2.** Análise hemodinâmica do ventrículo esquerdo (VE).

	<b>JS</b> <b>(n=10)</b>	<b>IS</b> <b>(n=9)</b>	<b>IT</b> <b>(n=10)</b>
<b>FC (bpm)</b>	349 ± 17	389 ± 4	366 ± 11
<b>PSVE (mmHg)</b>	119 ± 3	123 ± 6	127 ± 5
<b><math>PD_2</math> (mmHg)</b>	2,4 ± 0,2	3,7 ± 0,2*	4,7 ± 0,4*
<b>+dP/dt (mmHg/s)</b>	8101 ± 624	9340 ± 680	8175 ± 752
<b>-dP/dt (mmHg/s)</b>	6603 ± 390	5811 ± 574	5926 ± 321

Análise hemodinâmica do ventrículo esquerdo (VE) no final do estudo. FC, Frequência cardíaca; PSVE, pressão sistólica do VE;  $PD_2$ , pressão diastólica final do VE; +dP/dt, derivada temporal da pressão máxima positiva; -dP/dt, derivada temporal da pressão máxima negativa. Os dados foram analisados com ANOVA uma via e pós-teste de Newman-Keuls. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo JS.

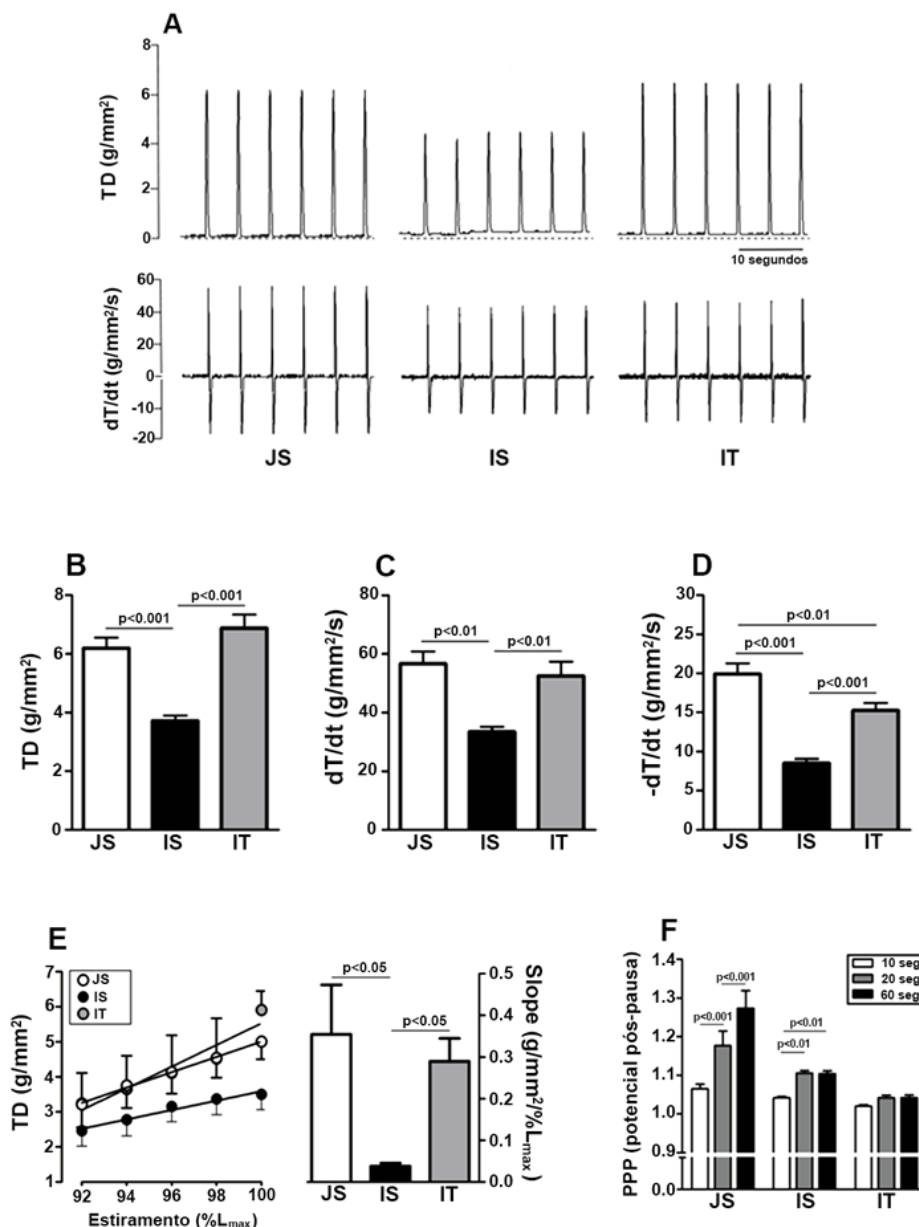
#### 4.4. TFN melhora a mecânica miocárdica de ratos idosos

Como ilustrado na Figura 9, a mecânica miocárdica foi significativamente deprimida no grupo IS comparado ao grupo JS; o resultado é representado por valores inferiores da TD, +dT/dt e -dT/dt (Figura 9A-D). A mecânica miocárdica foi significativamente melhorada com TFN, em que os músculos papilares do grupo IT exibiram valores de TD e +dT/dt semelhantes ao grupo JS, bem como maior valor de -dT/dt em comparação ao grupo IS.

Ao plotar a TD em função da variação do comprimento muscular, as retas inerentes ao grupo IS exibiram inclinações inferiores as observadas nos demais grupos, o que resultou em valores de *slope* significativamente menores (Figura 9E). Todavia, em ratos idosos submetidos ao TFN, o padrão de normalidade das retas foi preservado, o que indica preservação do mecanismo de Frank-Starling.

A Figura 9F ilustra dados de experimentos realizados para determinar a resposta inotrópica do miocárdio a interrupções do estímulo, um fenômeno conhecido como potenciação pós-pausa e que permite avaliar indiretamente a função do retículo sarcoplasmático. No miocárdio intacto de rato, a PPP é

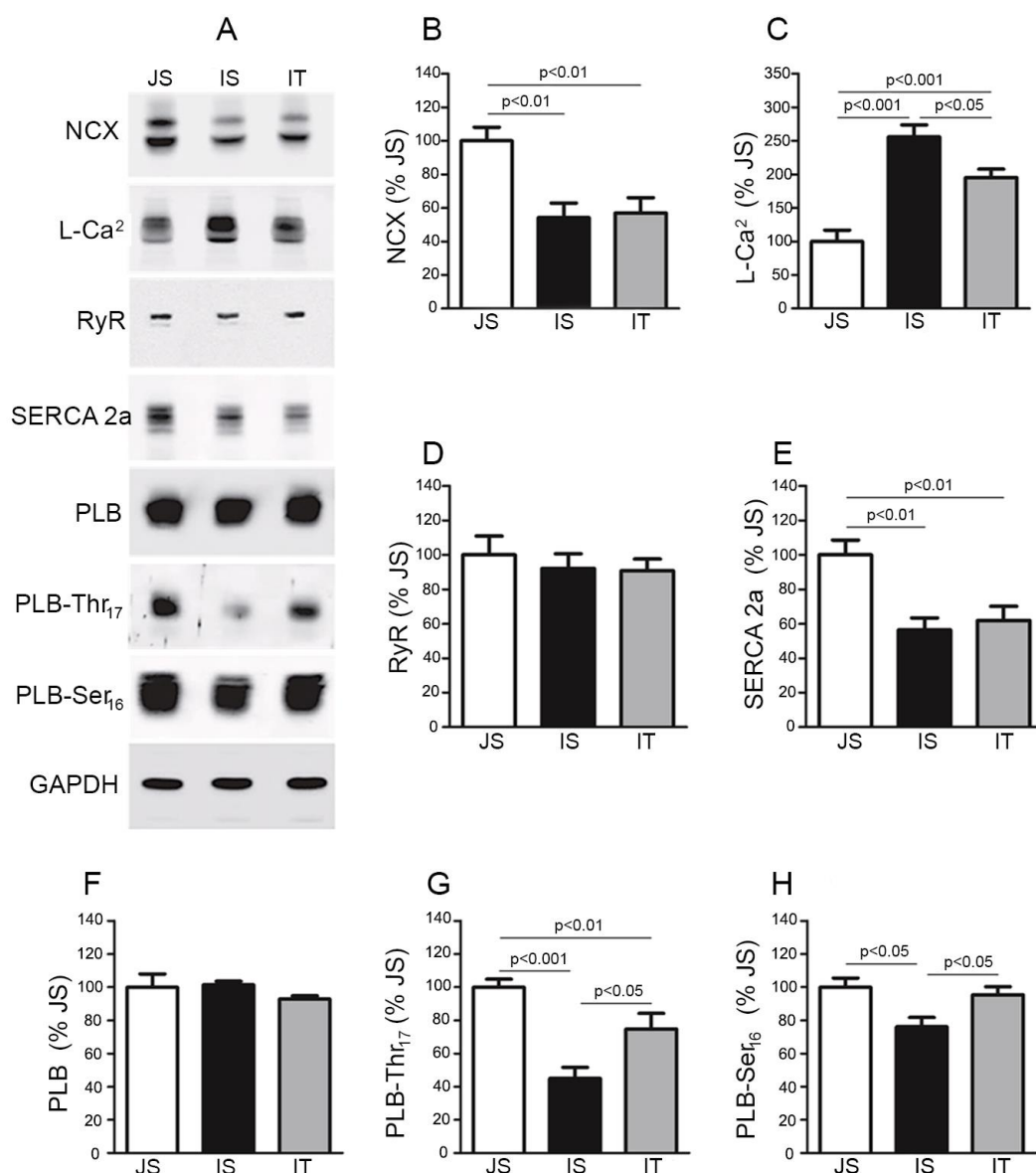
potencializada devido ao  $\text{Ca}^{2+}$  adicional acumulado no RS durante a pausa de estímulo e, seguinte liberação do íon após a ativação, o que foi evidente no grupo JS. No entanto, em músculos de ratos idosos, o comportamento da PPP foi alterado. Assim, houve um platô da força muscular após a primeira pausa de estímulo e que ocorreu independente do treinamento físico.



**Figura 9.** Desempenho miocárdico *in vitro* de músculos papilares em comprimentos correspondentes a 100% de  $L_{max}$  (JS,  $n = 10$ ; IS,  $n = 9$ ; IT,  $n = 10$ ). (A) Traçados típicos que representam parâmetros mecânicos do músculo papilar. (B) tensão máxima desenvolvida (TD). Derivada da tensão desenvolvida positiva (C, +dTD/dt) e negativa (D, -dTD/dt). (E) As linhas retas foram ajustadas às relações de comprimento-tensão desenvolvidas usando análise de regressão linear. Os slopes das inclinações estão dispostos à direita. Os dados foram analisados com ANOVA uma via e pós-teste Newman-Keuls. (F) Contração pós-pausa de estímulo (PPP). O teste de ANOVA de duas vias para amostras repetidas e seguido por Bonferroni foram aplicados nas comparações. O nível de significância para comparações é mostrado acima das barras. JS, jovem sedentário; IS, idoso sedentário; IT, idoso treinado.

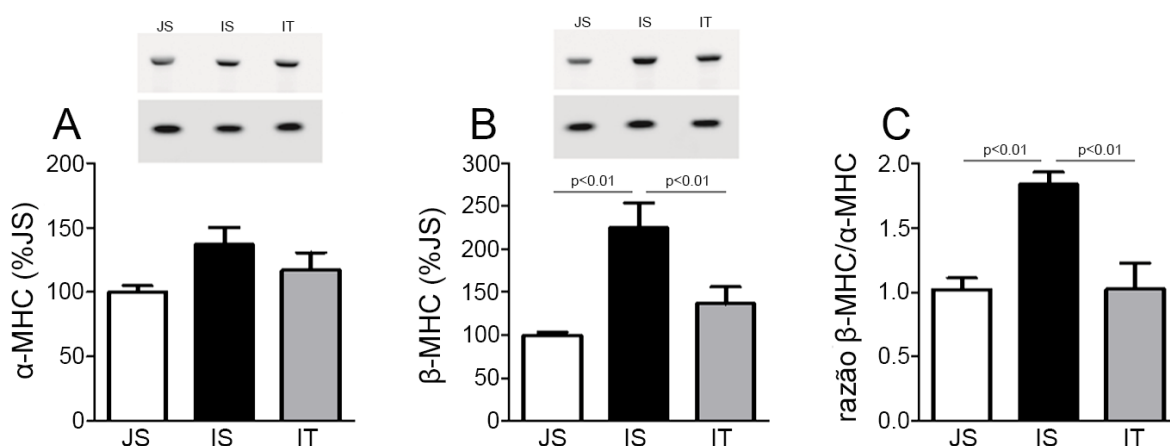
#### 4.5. Expressão miocárdica de proteínas que modulam a cinética do $\text{Ca}^{2+}$ e isoformas da miosina

A expressão miocárdica do NCX, SERCA2a, PLB-Thr<sub>17</sub> e PLB-Ser<sub>16</sub> foi significativamente menor no grupo IS (Figura 10). Além disso, os animais IS apresentaram maior teor do L- $\text{Ca}^{2+}$ . O treinamento atenuou os efeitos do envelhecimento na expressão do L- $\text{Ca}^{2+}$ , PLB-Thr<sub>17</sub> e PLB-Ser<sub>16</sub>.



**Figura 10.** Expressão de proteínas que modulam a cinética do  $\text{Ca}^{2+}$  no miocárdio (JS,  $n = 10$ ; IS,  $n = 9$ ; IT,  $n = 10$ ). (A) Blots representativos dos experimentos. (B) trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX); (C) canal de cálcio tipo L (L- $\text{Ca}^{2+}$ ); (D) receptor de rianodina (RyR); (E) retículo sarcoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a); (F) fosfolamban (PLB); (G) fosfolamban fosforilada na treonina 17 (PLB-Thr<sub>17</sub>) e (H) fosfolamban fosforilada na serina 16 (PLB-Ser<sub>16</sub>). Os dados foram analisados com ANOVA uma via e pós-teste Newman-Keuls. JS, jovem sedentário; IS, idoso sedentário; IT, idoso treinado.

Dados referentes a expressão miocárdica das proteínas  $\alpha$ -MHC e  $\beta$ -MHC são visualizáveis na Figura 11. Não houve diferenças significantes entre os grupos para a expressão da  $\alpha$ -MHC (A). Porém, a expressão de  $\beta$ -MHC foi aumentada no grupo IS e inalterada no grupo IT (B). Assim, a relação  $\alpha/\beta$ -MHC foi maior no grupo IS e preservada em animais idosos treinados (Figura 11C).



**Figura 11.** A expressão de proteínas das isoformas  $\alpha$ -MHC e  $\beta$ -MHC é mostrada em **A** e **B**, respectivamente. **(C)**  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC. Todos os valores foram normalizados para níveis de GAPDH. A ANOVA uma via e o teste pós-teste de Newman-Keuls foram aplicados para detectar diferenças entre os grupos. O nível de significância para comparações está apresentado acima das barras. JS, jovem sedentário; IS, idoso sedentário; IT, idoso treinado.



## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi conduzido para analisar o impacto do TFN no remodelamento cardíaco e mecânica miocárdica de ratos idosos. Os experimentos realizados geraram três achados principais. (1) a hipertrofia dos cardiomiócitos induzida pelo TFN foi acompanhada de efeito protetor da microestrutura miocárdica. Assim, aumento no colágeno intersticial não foi presente em ratos idosos treinados; (2) ratos idosos exibiram função VE preservada, circunstância que não foi notada quando o desempenho do miocárdio foi analisado isoladamente. Ocorre que, ratos idosos exibiram depressão do inotropismo miocárdico e velocidade de contração e relaxamento menor que animais jovens. Todavia, o TFN resultou em normalização dos parâmetros de função sistólica do músculo e atenuação do efeito deletério do envelhecimento no relaxamento miocárdico; (3) No que se refere à possíveis explicações para nossos achados funcionais, nós analisamos a expressão de proteínas cruciais de modulação da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  no miocárdio. Em ratos idosos, o teor das proteínas NCX, SERCA 2a, PLB-Thr17 e PLB-Ser16 foi menor em comparação à animais jovens. Todavia, a concentração do L- $\text{Ca}^{2+}$  foi significativamente aumentada. Nesse cenário, a natação atenuou os efeitos do envelhecimento na expressão miocárdica do L- $\text{Ca}^{2+}$ , PLB-Thr17 e PLB-Ser16. Acresça-se que ratos idosos apresentaram aumento da subunidade beta da cadeia pesada da miosina, o que não ocorreu quando da realização do treinamento físico.

É bem conhecido que a resistência aeróbia diminui com o envelhecimento e, assim, idosos exibem valores de consumo máximo de oxigênio significativamente menores comparados a adultos jovens do mesmo gênero. De importância emerge a repercussão do EF como ferramenta para abrandar os efeitos adversos do envelhecimento, impondo melhora da aptidão cardiovascular e funcional (Harridge et al., 2017). Em nosso estudo, optamos por avaliar o impacto do TFN empregando análise de duas variáveis –  $\text{VO}_{2\text{pico}}$  em esteira e tempo de nado até exaustão. O  $\text{VO}_{2\text{pico}}$  é considerado padrão ouro na determinação da capacidade cardiovascular em esforço (Carlson, 1995). Porém, em nossas condições, o  $\text{VO}_{2\text{pico}}$  não possibilitou identificar diferenças entre os grupos experimentais em análises conduzidos no início e ao final do período experimental. Circunstância oposta foi notada quando da aplicação do teste em piscina. Como ilustrado na Figura 5B, a



resistência aeróbia foi deprimida em ratos idosos, condição que foi abolida com o TFN. De fato, o impacto positivo do EF é apoiado nos valores de tempo de nado superiores em ratos idosos treinados, inclusive, em comparação com ratos jovens. É difícil estabelecer porque os métodos de avaliação discordaram em caracterizar o efeito da idade e do treinamento físico na resistência aeróbia. A respeito da repercussão do EF, é possível que a especificidade do treinamento possua papel importante. Assim, em programas de treinamento de natação, o teste de esforço em piscina é mais apropriado para detectar melhora da aptidão física. Todavia, avaliações conduzidas em esteira parecem não revelarem alterações na resistência aeróbia de ratos idosos submetidos ao TFN.

Análises biométricas ao final do estudo evidenciaram que a massa miocárdica relativizada ao peso corporal foi aumentada em ratos idosos. A existência de hipertrofia miocárdica foi confirmada pelo aumento do volume nuclear dos cardiomiócitos. Em idosos, há aumento da perda de miócitos por apoptose e necrose, com seguinte substituição por fibras colágenos (Fratelli et al. 1989). Essa condição desperta aumento dos cardiomiócitos remanescentes, aumento da rigidez miocárdica e progressão da disfunção cardíaca (Anversa et al., 1986 Alencar et al., 2017).

Vale mencionar o efeito aditivo do TFN na hipertrofia miocárdica, com os animais treinados cursando com valores de massa cardíaca e VE, e volume nuclear dos cardiomiócitos, superiores em comparação com animais que permaneceram sem exercício, jovens ou idosos. Nossos dados não permitem caracterizar se o estímulo hipertrófico induzido pelo exercício é análogo ou distinto daquele despertado pelo envelhecimento. Sabe-se que a expressão de  $\beta$  e  $\alpha$ -MHC é alterada na hipertrofia cardíaca e mostrou estar diretamente correlacionada com disfunção miocárdica (Nadal-Ginard & Mahdavi, 1989).

Considerando o remodelamento da matriz extracelular, o aumento no teor de colágeno foi evidente em ratos idosos, com valores médios equivalentes ao dobro do registrado em animais jovens. O aumento na deposição de colágeno no coração idoso é bem documentado na literatura (Masson et al., 2000; Alencar et al., 2017). Em relação ao exercício, nós observamos que animais treinados não exibiram aumento do colágeno, com expressão similar ao grupo JS. Embora outros investigadores reportaram resultados semelhantes aos nossos, o efeito benéfico do

treinamento físico no teor de colágeno miocárdico não é achado concordante na literatura. Thomas et al. (2001) dosaram a concentração de hidroxiprolina (um marcador de colágeno) no VE de ratos com 22 meses de idade e observaram menor teor do aminoácido em ratos treinados em esteira por 10 semanas. Entretanto, em estudo conduzido com ratos em idade similar e treinados em esteira por 12 semanas, não houve efeito do exercício no teor de colágeno (Tomanek et al., 1972). A razão pela qual os estudos prévios e, nosso trabalho, destoam a respeito da repercussão do treinamento físico no teor de colágeno, é de difícil compreensão. É possível que variações nas linhagens dos roedores, no estado maturacional e nos protocolos de treinamento físico possam atuar para gerar resultados conflitantes.

Dados morfofuncionais do VE foram obtidos por técnica ecocardiográfica e hemodinâmica. A comparação entre animais jovens e idosos não revelou diferenças marcantes que possibilitem caracterizar anomalias inerentes a idade. De fato, os valores maiores da PD<sub>2</sub> em ratos idosos foram achados que despertaram mais atenção. A análise preliminar destes dados conduziria a acreditar na presença de disfunção diastólica. No entanto, os níveis de PD<sub>2</sub> enquadram-se no intervalo de ~ 3,7 a 4,7 mmHg em ratos idosos, o que corresponde à faixa de normalidade para ratos Wistars jovens saudáveis (Saraiva et al., 2007). Quando evidente, a disfunção diastólica é atribuída à diminuição da complacência do VE, que resultado do aumento na rigidez miocárdica (Arbab-Zadeh et al., 2004; Feng et al., 2016). Nós não analisamos a rigidez miocárdica, mas o aumento do teor de colágeno seduz a acreditar que poderia constituir fator causal (Thomas et al., 2001; Arbab-Zadeh et al., 2004). Vale notar que os níveis de colágeno documentados em nosso estudo são inferiores a 1% da área do VE, o que poderia não implicar em modificação substancial da rigidez miocárdica e, por conseguinte, em alterações diastólicas evidentes. A este respeito, depressões significativas no desempenho diastólico do VE são documentadas para modelos experimentais que resultem em aumento expressivo do teor de colágeno e, em que os valores excedem aos documentados por nós (Nishimura et al., 19985; Burgess et al., 1996; Serra et al. 2010).

É razoável considerar que a ausência de modificações no desempenho VE não eximem a presença de disfunção miocárdica em ratos idosos. De fato, alterações no desempenho miocárdico foram documentadas há mais de 40 anos. Como estudo pioneiro, menciona-se experimentos conduzidos por Lakatta et al.

(1975) em trabéculas isoladas do VE de ratos com 25 meses de idade. Os pesquisadores observaram que, embora a tensão ativa e a taxa máxima de tensão desenvolvida não estavam deprimidas, a duração da contração foi significativamente superior. Outros investigadores estenderam esses achados ao documentarem redução da força desenvolvida, da taxa de aumento da tensão e da velocidade de encurtamento em trabéculas de cães idosos (Urthaler et al., 1978). A visão preliminar destes achados conduziria a acreditar que a repercussão do envelhecimento na mecânica miocárdica constitui assunto definitivo. Todavia, há estudos que desacordam em muitos parâmetros que compõem a mecânica miocárdica. Guarnieri et al (1980) não reportaram depressão da força desenvolvida e duração da contração do septo interventricular perfundido in vitro de ratos Wistar de 22 meses de idade. Ao estudar músculos papilares de ratos com 24 meses de idade, Capasso et al. (1981) não reportaram depressão da força desenvolvida. Porém, os autores observaram aumento na tensão de repouso e no tempo para alcance do pico de tensão e relaxamento. Contrariamente, outros investigadores não registraram alterações na velocidade de contração de trabéculas extraídas de ratos com 24 meses de idade (Walford et al., 1988). Em nossos casos, músculos papilares em contração isométrica exibiram alterações mecânicas patentes, com reduções na tensão desenvolvimento e velocidade de contração e relaxamento em ratos com 24 meses de idade. Acresça-se prejuízos da resposta inotrópica à diferentes pausas de estimulação. De fato, como a maior parte do  $\text{Ca}^{2+}$  retorna ao RS durante o repouso, seu conteúdo tende a se acumular com o prolongamento da pausa de estímulo, aumentando também a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e a geração de força na contração seguinte (Bocalini et al., 2012). Assim, depressões na potenciação pós-pausa podem ser atribuídas ao prejuízo funcional do RS devido à diminuição no conteúdo de SERCA 2a e suas proteínas reguladoras (PLB-Thr<sub>17</sub>/Ser<sub>16</sub>). Além disso, as alterações na expressão da SERCA 2a e PLB-Tr<sub>17</sub>/Ser<sub>16</sub> documentadas na Figura 8 podem explicar, ao menos parcialmente, a disfunção miocárdica em músculos papilares de ratos idosos (Jiang et al., 1993).

Outro achado documentado por nós constituiu é a redução na expressão miocárdica do NCX e aumento do L- $\text{Ca}^{2+}$ , circunstância que, até onde sabemos, foi previamente descrita apenas por um grupo de investigadores (Howlett et al., 1992). Considerando a participação consolidada na cinética do  $\text{Ca}^{2+}$ , o entendimento da

repercussão da expressão reduzida do NCX e aumentada do L-Ca<sup>2+</sup> para o transiente de Ca<sup>2+</sup> no cardiomiócito idoso perfaz meta razoável. Há dados que ilustram prolongamento do transiente de Ca<sup>2+</sup> (Tate et al., 1990), maior acúmulo de Ca<sup>2+</sup> (Ataka et al., 1992) e decaimento transitório mais lento do íon no miocárdio idoso (Keller et al., 2016). De fato, nossos dados estão em linha com essas observamos na medida que o aumento no teor L-Ca<sup>2+</sup> pode resultar em elevação do transiente do íon na sístole miocárdica e a redução da SERCA 2a e suas proteínas reguladoras pode dificultar a retirada do Ca<sup>2+</sup> citosólico em diástole (Bers, 2002; Azevedo et al., 2016). Assim, é previsível que haja maior entrada de Ca<sup>2+</sup> no cardiomiócito via L-Ca<sup>2+</sup> durante o potencial de ação, o que poderia explicar fases de contração mais prolongadas. Soma-se a coexistência de maior concentração do Ca<sup>2+</sup> citosólico em decorrência da capacidade reduzida de efluxo celular via redução da SERCA 2a e do NCX. Evidentemente, a aceitação dessa proposta no miocárdio idoso necessidade de investigação.

Os dados ilustrados na Figura 9 também possibilitam compor entendimento acerca da participação de alterações em proteínas sarcoméricas na disfunção miocárdica induzida pelo envelhecimento. Decorre que, ratos idosos não treinados exibiram o dobro de expressão miocárdica da  $\beta$ -MHC em relação à animais jovens. Esses achados corroboram investigações anteriores de outros investigadores (Ameredes et al., 1998; Carnes et al., 2004). A  $\beta$ -MHC é distinta da isoforma rápida, referida como  $\alpha$ -MHC. Assim, é possível aceitar que a diminuição na velocidade de contração dos músculos papilares (i.e.  $+dT/dt$ ) pode ser atribuída, em certo grau, ao aumento na expressão da  $\beta$ -MHC (Carnes et al., 2004 Gupta, 2007). Também deve ser mencionado que a troca na preponderância de  $\alpha$ -MHC por  $\beta$ -MHC possui participação na lentificação do relaxamento miocárdica que ocorre com envelhecimento (Keller et al., 2016). Dessa forma, acrescida dos achados de aumento no teor de colágeno e redução de proteínas chaves de modulação da cinética do Ca<sup>2+</sup>, entende-se porque os valores da  $-dT/dt$  foram significativamente menores em músculos papilares idosos.

Finalmente, investigamos a repercussão do TFN nas alterações mecânicas de músculos papilares dos ratos idosos. Nós optamos por impor um regime de treinamento físico aeróbio em piscina ao considerar que essa metodologia gera adaptações cardiovasculares benéficas bem documentadas (Lazar et al., 2013).

Além disso, a experiência prévia de nosso grupo com outras modalidades de exercício aeróbio, como o treinamento em esteira, não gerou melhora inotrópica significativa (Serra et al., 2008; Serra et al., 2010). Menciona-se, ainda, como principal fator limitante a necessidade de seleção de animais que correm espontaneamente ou a retirada de ratos que abdicam de correr ao longo do protocolo.

Nossos dados relativos à mecânica dos músculos papilares estão em concordância com a literatura prévia que analisou o papel do exercício aeróbio (Gwathmey et al., 1985). Tate et al. (1990) estudaram os efeitos de oito semanas de treinamento de corrida em músculos papilares de ratos com 23 meses de idade. Os autores observaram que o treinamento normalizou os valores de duração da contração, tempo para pico de tensão e tensão de repouso para níveis similares ao observado em ratos jovens. Em nossos casos, o inotropismo miocárdico e a velocidade de encurtamento foram normalizados em ratos idosos treinados; o efeito do envelhecimento no relaxamento miocárdico (expressão pela  $-dT/dt$ ) foi atenuado pelo exercício. Nota-se, ainda, que a análise da resposta contrátil ao estiramento, o que possibilita avaliar a integridade da relação de Frank-Starling, resultou em valores similares de *slope* entre o grupo jovem e idoso treinado.

A respeito dos mecanismos participantes da manutenção das propriedades contráteis miocárdio, atribui-se ao exercício o aumento dos estoques de catecolaminas teciduais (Gwathmey et al., 1990), a melhora do metabolismo energético (Starnes et al., 1983; Lemitsu et al., 2002) e a preservação do número de miócitos via atenuação da apoptose (Kwak et al., 2006; Lai et al., 2014). Em nossos casos, o interesse residiu em determinar se o treinamento físico poderia impor adaptações benéficas em diferentes proteínas que modulam a cinética do  $Ca^{2+}$ . Desarranjos no transiente de  $Ca^{2+}$  são pontuados como determinantes da disfunção miocárdica induzida em idosos (Tang et al., 2011; Thomas et al., 2011; Fernandez-Sanz et al., 2011). De fato, o treinamento físico atenuou os efeitos do envelhecimento na expressão miocárdica do L- $Ca^{2+}$  e as subunidades reguladoras da SERCA 2a – fosfolambam treonina 17 e serina 16, o que constitui fundamento para a manutenção das propriedades inotrópicas do miocárdio de ratos treinados. Acresça-se fenômeno observado na Figura 9E, em que as curvas de tensão-comprimento dos grupos JS e IT foram sobrepostas, indicando que a sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  está

preservada no miocárdio idoso de ratos treinados. Além disso, o efeito do treinamento na subunidade lenta da cadeia da miosina ( $\beta$ -MHC) pode explicar, ao menos em parte, a normalização da velocidade de contração dos músculos papilares.



## 6. CONCLUSÃO

O TFN atenuou o remodelamento cardíaco em ratos idosos, com benefícios na matriz extracelular e na mecânica miocárdica. Em sintonia, o treinamento físico abrandou as alterações em proteínas chaves que modulam a da cinética do cálcio e regulação funcional do sarcômero.



## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abete P, Cacciatore F, Testa G, Della-Morte D, Galizia G, de Santis D, Calabrese C, Cioppa A, Ferrara N, Rengo F. Ischemic preconditioning in the aging heart: from bench to bedside. *Ageing Res Rev*, 9:153-62, 2010.

Abreu G, Vassallo D, Mill J. The  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange mechanism as a regulator of post rest contractions in cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*, 20:817-20, 1987.

Alencar AK, da Silva JS, Lin M, Silva AM, Sun X, Ferrario CM, Cheng C, Sudo RT, Zapata-Sudo G, Wang H, Groban L. Effect of age, estrogen status, and late-life gper activation on cardiac structure and function in the fischer344xbrown norway female rat. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(2):152-162.

Ameredes BT, Daood MJ, Watchko JF. Refeeding reverses cardiac myosin shifts induced by undernutrition in aged rats: modulation by growth hormone. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30(8):1525-33.

Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *Am Coll Cardiol*, 8:1441-8, 1986.

Arbab-Zadeh A, Dijk E, Prasad A, et al. Effect of aging and physical activity on left ventricular compliance. *Circulation*. 2004; 110:1799–1805. doi:10.1161/01.CIR.0000142863.71285.74

Ataka K, Chen D, Levitsky S, Jimenez E, Feinberg H. Effect of aging on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pHi}$ , and contractility during ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1992;86 (5 Suppl): II371-6.

Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arq Bras Cardiol*. 2016;106(1):62-9.

Barmeyer A, Müllerleile K, Mortensen K, Meinertz. Diastolic dysfunction in exercise and its role for exercise capacity. *Heart Fail Rev*, 14:125-134, 2009.

Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002.

Bocalini DS, Serra AJ, Murad N, Levy RF. Water-versus land-based exercise effects on physical fitness in older women. *Geriatr Gerontol Int*, 8:265-271, 2008.

Bocalini DS, Carvalho EV, de Sousa AF, Levy RF, Tucci PJ. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol*, 109:909-914, 2010.

Bocalini DS, dos Santos L, Antonio EL, et al. Myocardial remodeling after large infarcts in rat converts post rest-potential in force decay. *Arq Bras Cardiol*. 2012; 98: 243–251.



Bonilha AMM, Saraiva RM, Kanashiro RM, Portes LA, Antonio EL, Tucci PJF. A routine electrocardiogram cannot be used to determine the size of myocardial infarction in the rat. *Braz J Med Biol Res*, 38:615-19, 2005.

Burgess ML, Buggy J, Price RL, Abel FL, Terracio L, Samarel AM, Borg TK. Exercise- and hypertension-induced collagen changes are related to left ventricular function in rat hearts. *Am J Physiol*. 1996; 270(1 Pt 2):H151-9.

Capasso JM, Remily RM, Sonnenblick EH. Age-related differences in excitation-contraction coupling in rat papillary muscle. *Basic Res Cardiol*. 1983; 78(5):492-504.

Capasso JM, Malhotra A, Remily RM, Scheuer J, Sonnenblick EH. Effects of age on mechanical and electrical performance of rat myocardium. *Am J Physiol*. 1983;245(1):H72-81.

Carlson DJ. VO<sub>2</sub>max: the gold standard? *Chest*. 1995;108:602–603. *Basic Res Cardiol*, 78:492-504, 1983.

Carnes CA, Geisbuhler TP, Reiser PJ. Age-dependent changes in contraction and regional myocardial myosin heavy chain isoform expression in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2004;97(1):446-53.

Chantler PD, Lakatta EG. Arterial-ventricular coupling with aging and disease. *Front Physiol*. 2012;3:90. Epub 2012

Chung E, Diffie GM. Moderate intensity, but not high intensity, treadmill exercise training alters power output properties in myocardium from aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:1178–1187. doi:10.1093/gerona/gls146

Cury AF, Bonilha A, Saraiva R, Campos O, Carvalho ACC, De Paola AAV, Fischer C, Tucci PF, Moises VA. Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: Relationship with ventricular function parameters by Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*, 18:454-60, 2005.

DATASUS. Indicadores demográficos. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2010/a15> Acessado em Junho de 2012.

da Silva RL, Silva KA, Rampaso RR, Antonio EL, Montemor J, Bocalini DS, Dos Santos L, Moura L, Tucci PJ, de Abreu NP, Schor N. Exercise attenuates renal dysfunction with preservation of myocardial function in chronic kidney disease. *PLoS One*. 2013;8(2):e55363. doi: 10.1371/journal.pone.0055363. Epub 2013 Feb 7.

de Melo BL, Vieira SS, Antônio EL, Dos Santos LF, Portes LA, Feliciano RS, de Oliveira HA, Silva JA Jr, de Carvalho PT, Tucci PJ, Serra AJ. Exercise Training Attenuates Right Ventricular Remodeling in Rats with Pulmonary Arterial Stenosis. *Front Physiol*. 2016 Dec 5;7:541. eCollection 2016.

de Salvi-Guimarães F, de Moraes WM, Bozi LH, Souza PR, Antonio EL, Bocalini DS, Tucci PJ, Ribeiro DA, Brum PC, Medeiros A. Dexamethasone-induced cardiac deterioration is associated with both calcium handling abnormalities and calcineurin

signaling pathway activation. *Mol Cell Biochem.* 2017 Jan;424(1-2):87-98. doi: 10.1007/s11010-016-2846-3. Epub 2016 Oct 19.

dos Santos L, Antonio EL, Souza AF, Tucci PJ. Use of afterload hemodynamic stress as a practical method for assessing cardiac performance in rats with heart failure. *Can J Physiol Pharmacol*, 88:724-32, 2010.

dos Santos L, Gonçalves GA, Davel AP, Santos AA, Krieger JE, Rossoni LV, Tucci PJ. Cell therapy prevents structural, functional and molecular remodeling of remote non-infarcted myocardium. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 9;168(4):3829-36. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.06.026. Epub 2013 Jul 12.

Feng W, Xu X, Zhao G, et al. Increased age-related cardiac dysfunction in bradykinin B2 receptor-deficient mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2016;71:178–187. doi:10.1093/gerona/glu210

Fernandez-Sanz C, Ruiz-Meana M, Miro-Casas E, Nuñez E, Castellano J, Loureiro M, Barba I, Poncelas M, Rodriguez-Sinovas A, Vázquez J, Garcia-Dorado D. Defective sarcoplasmic reticulum-mitochondria calcium exchange in aged mouse myocardium. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1573.

Floegel TA, Perez GA. An integrative review of physical activity/exercise intervention effects on function and health-related quality of life in older adults with heart failure. *Geriatr Nurs.* 2016;37:340–347. doi:10.1016/j.gerinurse.2016.04.013

Fraticeilli A, Josephson R, Danziger R, Lakatta E, Spurgeon H. Morphological and contractile characteristics of rat cardiac myocytes from maturation to senescence. *Am J Physiol.* 1989 Jul;257(1 Pt 2):H259-65.

Freitas AA, Magalhães JP. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2011;728:12-22.

Fujimoto N, Prasad A, Hastings JL, Zadeh-Arbab A, Bhella PS, Shibata S, Palmer D, Levine BD. Cardiovascular effects of 1 year of progressive and vigorous exercise training in previously sedentary individuals older than 65 years of age. *Circulation*, 122:1797-1805, 2010

Gerstenblith G, Frederiksen J, Yin FC, Fortuin NJ, Lakatta EG, Weisfeldt ML. Echocardiographic assessment of a normal adult aging population. *Circulation.* 1977; 56: 273-278.

Grandy SA, Howlett SE. Cardiac excitation-contraction coupling is altered in myocytes from aged male mice but not in cells from aged female mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291:2362-2370, 2006.

Guaraldo SA, Serra AJ, Amadio EM, et al. The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise. *Lasers Med Sci.* 2016;31:833–840.doi:10.1007/s10103-016-1882-2

Guarnieri T, Filburn CR, Zitnik G, Roth GS, Lakatta EG. Contractile and biochemical correlates of beta-adrenergic stimulation of the aged heart. *Am J Physiol.* 1980;239(4):H501-H508.

Giampá SQ, Mônico-Neto M, de Mello MT, Souza HS, Tufik S, Lee KS, Koike MK, Dos Santos AA, Antonio EL, Serra AJ, Tucci PJ, Antunes HK. Paradoxical Sleep Deprivation Causes Cardiac Dysfunction and the Impairment Is Attenuated by Resistance Training. *PLoS One.* 2016 Nov 23;11(11):e0167029. doi: 10.1371/journal.pone.0167029. eCollection 2016.

Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:388–403.doi:10.1016/j.yjmcc.2007.07.045

Gwathmey JK, Slawsky MT, Perreault CL, Briggs GM, Morgan JP, Wei JY. Effect of exercise conditioning on excitation-contraction coupling in aged rats. *J Appl Physiol,* 4:1366-71, 1990.

Harridge SD, Lazarus NR. Physical Activity, Aging, and Physiological Function. *Physiology* (Bethesda). 2017;32(2):152-161.

Heckman GA, MD, McKelvie RS. Cardiovascular Aging and Exercise in Healthy Older Adults. *Clin J Sport Med,* 18:479-485, 2008.

Howlett SE, Nicholl PA. Density of 1,4-dihydropyridine receptors decreases in the hearts of aging hamsters. *J Mol Cell Cardiol.* 1992;24:885–894.

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Aging-induced decrease in the PPAR $\alpha$  level in hearts is improved by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H1750–H1760. doi:10.1152/ajpheart.01051.2001

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Exercise training improves cardiac function-related gene levels through thyroid hormone receptor signaling in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1696–H1705.

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Tanabe T, Takanashi M, Matsuda M, Yamaguchi I. Exercise training improves cardiac function-related gene levels through thyroid hormone receptor signaling in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 2004, 286:1696-1705.

Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Miyauchi T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 2006, 291:1290-1298.

Jiang MT, Moffat MP, Narayanan N. Age-related alterations in the phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins and diminished contractile response to isoproterenol in intact rat ventricle. *Circ Res.* 1993 Jan;72(1):102-11.

Karavidas A, Lazaros G, Tsiachris D, Pyrgakis V. Aging and the cardiovascular system. *Hellenic J Cardiol.* 2010, 51(5):421-7.

Keller KM, Howlett SE. Sex differences in the biology and pathology of the aging heart. *Can J Cardiol*. 2016;32:1065–1073. doi:10.1016/j.cjca.2016.03.017

Kiriazis H, Gibbs CL. Effects of ageing on the activation metabolism of rat papillary muscles. *Clin Exp Pharm Physiol*, 28:176-183, 2001.

Kitabatake AI, Asao M, Masuyama T, Tanouchi J, Morita T, Mishima M, Uematsu M, Shimazu T, Hori M, Abe H. Noninvasive evaluation of pulmonary hypertension by a pulsed Doppler technique. *Circulation*, 68:302-09, 1983.

Koch LG, Britton SL, Wisloff U. A rat model system to study complex disease risks, fitness, aging, and longevity. *Trends Cardiovasc Med*.2012;22:29–34. doi:10.1016/j.tcm.2012.06.007

Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB J*. 2006;20:791–793. doi:10.1096/fj.05-5116fje

Lai CH, Ho TJ, Kuo WW, Day CH, Pai PY, Chung LC, Liao PH, Lin FH, Wu ET, Huang CY. Exercise training enhanced SIRT1 longevity signaling replaces the IGF1 survival pathway to attenuate aging-induced rat heart apoptosis. *Age (Dordr)*. 2014;36(5):9706.

Lakatta EG, Gerstenblith G, Angell CS, Shock NW, Weisfeldt ML. Prolonged contraction duration in aged myocardium. *J Clin Invest*. 1975;55(1):61-8.

Lakatta EG, Spurgeon HA. Effect of exercise on cardiac muscle performance in aged rats. *Fed Proc*, 46:1844-1849, 1987.

Lakatta EG, Sollot SJ. Perspectives on mammalian cardiovascular ageing: humans to molecules. *Com Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 132:699-721, 2002.

Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises. Part I: angining arteries: A “set up”for vascular disease. *Circulation*, 107:139-146, 2003.

Lazar JM1, Khanna N, Chesler R, Saliccioli L. Swimming and the heart. *Int J Cardiol*. 2013;168(1):19-26.

Leblanc N, Chartier D, Gosselin H, Roleau J. Age and gender differences in excitation-contraction coupling of the rat ventricle. *J Physiol*, 511:533-548, 1998.

Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Filippelli A, Lymperopoulos A, Zincarelli C, Fortunato F, Golino L, Marchese M, Espósito G, Rapacciuolo RB, Ferrara N, Koch WJ, Rengo F. Exercise training and  $\beta$ -blocker treatment ameliorate age-dependent impairment of  $\beta$ -adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293:1596-1603, 2007.

Li Y, Lincoln T, Mendelowitz D, Grossman W, Wei JY. Age-related differences in effect of exercise training on cardiac muscle function in rats. *Am J Physiol*, 251:H12-8, 1986.

Maifrino LBM, Araújo RC, Faccini CC, Liberti EA, Gama EF, Ribeiro AACM, Souza RR. Effect of exercise training on aging-induced changes in rat papillary muscle. *Arq Bras Cardiol*, 92:356-360, 2009.

Manchini MT, Serra AJ, Feliciano Rdos S, Santana ET, Antônio EL, de Tarso Camillo de Carvalho P, Montemor J, Crajoinas RO, Girardi AC, Tucci PJ, Silva JA Jr. Amelioration of cardiac function and activation of anti-inflammatory vasoactive peptides expression in the rat myocardium by low level laser therapy. *PLoS One*. 2014 Jul 3;9(7):e101270

Manchini MT, Antonio EL, Silva Junior JA, de Carvalho PT, Albertini R, Pereira FC, Feliciano R, Montemor J, Vieira SS, Grandinetti V, Yoshizaki A, Chaves M, da Silva MP, de Lima RD, Bocalini DS, de Melo BL, Tucci PJ, Serra AJ. Low-Level Laser Application in the Early Myocardial Infarction Stage Has No Beneficial Role in Heart Failure. *Front Physiol*. 2017;8:23

Masson S, Arosio B, Fiordaliso F, Gagliano N, Calvillo L, Santambrogio D, D'Aquila S, Vergani C, Latini R, Annoni G. Left ventricular response to beta-adrenergic stimulation in aging rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000;55(1):B35-41.

McArdle, WD. Metabolic stress of endurance swimming in the laboratory rat. *J Appl Physiol*; 22: 50-54, 1967.

Mill J, Vassallo D, Leite C. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*, 25:399-408, 1992.

Miller TR, Grossman SJ, Schectman KB, Biello DR, Ludbrook PA, Ehsani AA. Left ventricular diastolic filling and its association with age. *Am J Cardiol*, 58: 531-535, 1986.

Moisés VA, Ferreira RL, Nozawa E, Kanashiro RM, Campos Fº O, Andrade JL, Carvalho ACC, Tucci PJF. Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography. *Arq Bras Cardiol*, 75:131-36, 2000.

Nishimura H, Kubo S, Nishioka A, Imamura K, Kawamura K, Hasegawa M. Left ventricular diastolic function of spontaneously hypertensive rats and its relationship to structural components of the left ventricle. *Clin Sci (Lond)*. 1985;69(5):571-9.

Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho ACC, Cravo SLD, Campos O, Tucci PJF, Moises VA. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res*, 39:687-95, 2006.

Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, Buchner D, Ettinger W, Heath GW, King AC. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports. *JAMA*, 273:402-407, 1995.

Pepe S, Lakatta EG. Aging hearts and vessels: Masters of adaptation and survival. *Cardiovasc Res*, 66:190-193, 2005.

Portes, AL; Magalhães Saraiva, R; Alberta Dos Santos, A; Tucci PJ. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009; 36:394-399.

Prasad A, Popovic ZB, Arbab-Zadeh A, Fu Q, Palmer D, Dijk E, Greenberg NL, Garcia MJ, Thomas JD, Levine BD. The effects of aging and physical activity on doppler measures of diastolic function. *Am J Cardiol*, 99:1629 -1636, 2007.

Pugh KG, Wei JY. Clinical implications of physiological changes in the aging heart. *Drugs Aging*, 18:263-276, 2001.

Redheuil A, Yu WC, Mousseaux E, Harouni AA, Kachenoura N, Wu CO, Bluemke D, Lima JA. Age-related changes in aortic arch geometry: relationship with proximal aortic function and left ventricular mass and remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 58:1262-70, 2011.

Rica RL, Carneiro RMM, Serra AJ, Rodriguez D, Pontes Junior FL, Bocalini DS. Effects of water-based exercise in obese older women: impact of short-term follow-up study on anthropometric, functional fitness and quality of life parameters. *Geriatr Gerontol Int* (in press), 2012.

Santos MH, Higuchi Mde L, Tucci PJ, Garavelo SM, Reis MM, Antonio EL, Serra AJ, Maranhão RC. Previous exercise training increases levels of PPAR- $\alpha$  in long-term post-myocardial infarction in rats, which is correlated with better inflammatory response. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016 Mar;71(3):163-8. doi: 10.6061/clinics/2016(03)08.

Saraiva RM, Kanashiro-Takeuchi RM, Antonio EL, Campos O, P J F T, Moises VA. Rats with high left ventricular end-diastolic pressure can be identified by Doppler echocardiography one week after myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:1557–1565.

Serra AJ, Higuchi ML, Ihara SSM, Antonio EL, Santos MHH, Bombig MTNM, Tucci PJ. Exercise training prevents  $\beta$ -adrenergic hyperactivity-induced myocardial hypertrophy and lesions. *Eur J Heart Fail*, 10:453-539, 2008.

Serra AJ, Santos MHH, Bocalini DS, Antonio EL, Levy RF, Santos AA, Higuchi ML Silva Jr. JA, Magalhães FC, Baraúna VG, Krieger JE, Tucci PJF. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained  $\beta$ -adrenergic hyperactivity. *J Physiol*, 588:2431-2442, 2010.

Starnes JW, Beyer RE, Edington DW. Myocardial adaptations to endurance exercise in aged rats. *Am J Physiol*. 1983;245:H560–H566.

Taffet GE, Michael LA, Tate CA. Exercise training improves lusitropy by isoproterenol in papillary muscles from aged rats. *J Appl Physiol*, 81:1488-94, 1996.

Takagi G, Asai K, Vatner SF, Kudej RK, Rossi F, Peppas A, Takagi I, Resuelle RRG, Natividad F, Shen Y, Vatner DE. Gender differences on the effects of aging on cardiac and peripheral adrenergic stimulation in old conscious monkeys. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285:527-534, 2003.

Tang T, Hammond HK, Firth A, Yang Y, Gao MH, Yuan JX, Lai NC. Adenylyl cyclase 6 improves calcium uptake and left ventricular function in aged hearts. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(18):1846-55.

Tate CA, Taffet GE, Hudson EK, Blaylock SL, McBride RP, Michael LH. Enhanced calcium uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum in exercise-trained old rats. *Am J Physiol*, 258:431-435, 1990.

Taylor RP, Starnes JW. Age, cell signalling and cardioprotection. *Acta Physiol Scand*, 178:107-116, 2003.

Thomas DP, McCormick RJ, Zimmerman SD, Vadlamudi RK, Gosselin LE. Aging- and training-induced alterations in collagen characteristics of rat left ventricle and papillary muscle. *Am J Physiol*, 263:778-783, 1992.

Thomas DP, Cotter TA, Li X, McCormick RJ, Gosselin LE. Exercise training attenuates aging-associated increases in collagen and collagen crosslinking of the left but not the right ventricle in the rat. *Eur J Appl Physiol*. 2001;85:164–169. doi:10.1007/s004210100447

Thomas MM, Vigna C, Betik AC, Tupling AR, Hepple RT. Cardiac calcium pump inactivation and nitrosylation in senescent rat myocardium are not attenuated by long-term treadmill training. *Exp Gerontol*. 2011;46(10):803-10.

Tomanek RJ, Taunton CA, Liskop KS. Relationship between age, chronic exercise, and connective tissue of the heart. *J Gerontol*. 1972;27:33–38.

Urthaler F, Walker AA, James TN. The effect of aging on ventricular contractile performance. *Am Heart J*. 1978;96(4):481-5.

Yoshizaki A, Antonio EL, Silva Junior JA, Crajoinas RO, Silva FA, Girardi ACC, Bocalini DS, Portes LA, Dos Santos LFN, Carlos FP, Camillo de Carvalho PT, Tucci PJF, Serra AJ. Swimming Training Improves Myocardial Mechanics, Prevents Fibrosis, and Alters Expression of Ca<sup>2+</sup> Handling Proteins in Older Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018; 73(4):468-474.

Walford GD, Spurgeon HA, Lakatta EG. Diminished cardiac hypertrophy and muscle performance in older compared with younger adult rats with chronic atrioventricular block. *Circ Res*. 1988;63(3):502-1

Wei JY, Li Y, Lincoln T, Grossman W, Mendelowitz D. Chronic exercise training protects aged cardiac muscle against hypoxia. *J Clin Invest*, 83:778-84, 1989.

WHO. Ageing. <http://www.who.int/topics/ageing/en/>. Acessado em maio de 2012a.



## 8. ANEXOS

### 8.1. Comitê de ética para uso de animais (CEUA – UNIFESP)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 19 de fevereiro de 2014  
CEUA N 380783

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a): Amanda Yoshizaki dos Santos  
Depto/Disc: Medicina(cardiologia)  
Andrey Jorge Serra (orientador)  
Paulo José Ferreira Tucci (co-orientador)

Título do projeto: "CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NA DISFUNÇÃO CONTRÁTIL DO MIOCÁRDIO DE RATOS IDOSOS".

#### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A população nacional com idade acima de 60 anos supera 60 milhões de pessoas. Não há objeções que esta condição caracterize situação favorável, todavia, o aumento da longevidade também é acompanhado por maior incidência de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis. Dados mostram também que o exercício físico melhora a contratilidade do miocárdio envelhecido. Todavia, há dados na literatura que não ilustram qualquer efeito positivo do exercício físico, assim como não é claro a relação com o gênero, o que dificulta a tomada de decisão definitiva sobre o assunto. Avaliar se o exercício físico aeróbio pode atenuar o remodelamento cardíaco adverso e melhorar a contratilidade miocárdica de ratos idosos. OBJETIVO: Caracterizar se os benefícios do exercício físico podem ocorrer em animais do gênero masculino e feminino. Identificar mecanismos moleculares determinantes de possível aprimoramento de contratilidade miocárdica. METODOLOGIA: serão utilizados um total de 60 ratos (30 ratas fêmeas e 30 ratos machos, jovens e idosos) divididos em grupos que permanecerá sedentário ou com treinamento físico; teste de esforço físico em piscina para determinação da capacidade física máxima. Cerca de 48h após o teste, os animais serão submetidos a estudo da função ventricular esquerda e sacrificados para avaliação da contratilidade miocárdica "in vitro" e coleta de material biológico.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 23/05/2013, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo



## 8.2. Artigo publicado na revista Journal of Gerontology

ISSN 1079-5006 | PRINT • ISSN 1758-535X | ONLINE

VOL. 73 | NO. 4 • APRIL 2018

The Journals of  
**GERONTOLOGY**<sup>®</sup>  
Biological Sciences & Medical Sciences

SERIES *a*

OXFORD  
UNIVERSITY PRESS

OXFORD  OPEN

 THE  
GERONTOLOGICAL  
SOCIETY OF AMERICA<sup>®</sup>

## Original Article

# Swimming Training Improves Myocardial Mechanics, Prevents Fibrosis, and Alters Expression of Ca<sup>2+</sup> Handling Proteins in Older Rats

Amanda Yoshizaki, MSc,<sup>1</sup> Ednei Luiz Antonio, MSc,<sup>1</sup> José Antonio Silva Junior, PhD,<sup>2</sup> Renato Oliveira Crajoinas, PhD,<sup>3</sup> Flavio André Silva, MSc,<sup>1</sup> Adriana Castello Costa Girardi, PhD,<sup>3</sup> Danilo Sales Bocalini, PhD,<sup>4</sup> Leslie Andrews Portes, MSc,<sup>5</sup> Luis Felipe Neves dos Santos, MSc,<sup>1</sup> Fernando Pereira Carlos, MSc,<sup>2</sup> Paulo de Tarso Camillo de Carvalho, PhD,<sup>2</sup> Paulo José Ferreira Tucci, PhD,<sup>1</sup> and Andrey Jorge Serra, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of Biophotonic, Nove de Julho University, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Heart Institute (InCor), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup>Center for Physical Education and Sport, Federal University of Espírito Santo, São Paulo, Brazil. <sup>5</sup>UNASP—Adventist University of, São Paulo, Brazil.

Address correspondence to: Andrey Jorge Serra, PhD, Departamento de Biofotônica Aplicada as Ciências da Saúde. Universidade Nove de Julho, Rua Ararari 159, 03659-040 São Paulo, Brazil. E-mail: [andreyserra@gmail.com](mailto:andreyserra@gmail.com).

Received: August 4, 2017; Editorial Decision Date: November 29, 2017

**Decision Editor:** Rafael de Cabo, PhD

## Abstract

Exercise training effects on the contractility of aged myocardium have been investigated for more than 20 years, but the data are still unclear. This study evaluated the hypothesis that a swimming training (ST) may improve myocardial inotropism in older rats. Male Wistar rats aged 4 (young)-and 21 (old)-months-old were divided into young untrained (YNT), old untrained (ONT), and old trained (OTR; 6 weeks of ST) groups. Echocardiography and hemodynamic were employed to assess left ventricular morphology and function. Myocardial mechanics was evaluated on papillary muscles. Histological and immunoblotting were carried out to evaluate fibrosis and proteins that modulate the myocardial function and calcium handling. We found that older rats did not show cardiac dysfunction, but ONT group showed lower physical performance during a swimming test (YNT:  $5 \pm 2$ ; ONT:  $-16 \pm 0.4$ ; OTR:  $51 \pm 3$ ;  $\Delta\%$ , sec). Moreover, ONT group showed worse myocardial inotropism, in which it was reversed by ST (Peak developed tension: YNT:  $6.2 \pm 0.7$ ; ONT:  $3.9 \pm 0.3$ ; OTR:  $6.9 \pm 0.9$ ; g/mm<sup>2</sup>). The ST was associated with preserved collagen content (YNT:  $0.38 \pm 0.05$ ; ONT:  $0.78 \pm 0.12$ ; OTR:  $0.34 \pm 0.09$ ; %). Exercise partially mitigated the effects of aging on intracellular Ca<sup>2+</sup>-regulating protein (eg, L-Ca<sup>2+</sup> channel and phospholamban) and  $\beta$ -isoform of myosin. Thus, we propose that these molecular alterations together with inhibition of collagen increase contribute to improved myocardial performance in older rats.

**Keywords:** Aging, Cardiac remodeling, Contractile proteins, Myocardial performance, Physical training

Exercise training is widely recommended for the elderly because it improves their functional fitness, exercise tolerance, and quality of life (1). Moreover, a significant improvement in exercise-induced cardiac function can be achieved. For example, sedentary seniors (aged ~70 years) who completed 1 year of endurance training display significant improvement in left ventricular (LV) systolic function (2).

It has been proposed that changes in heart function may play a role in exercise training to improve myocardial contractile performance. Thus, previous investigations have analyzed effects of

chronic exercise on isolated myocardial contractile performance. This approach shows to be suitable for determining myocardial inotropism with the control of loading conditions, for example, pre- and after-loading. Although the effects of exercise training on the contractile function of aged myocardial tissue have been investigated for more than 20 years, the available data are still uncertain. In this regard, Tate and colleagues (3) and Gwathmey and colleagues (4) have analyzed isometric contractile properties of papillary muscles of approximately 24-months-old Fischer 344 rats and showed that

8–10 weeks of running improved myocardial performance (as indicated by time-to-peak muscle tension) in older rats. However, this is not a uniform finding, in which other studies have shown no effect of exercise training on myocardial function decline with aging. Wei and colleagues (5) evaluated reperfusion of treadmill running on myocardial mechanics of old (24- to 26-months-old) male Fischer rats and no reperfusion on developed tension and rate of tension development was reported. Similar results were reported by other investigators (6), where old (23- to 24-months-old) rats that were treadmill trained for 4–8 weeks did not show a significant improvement in myocardial performance.

Inconsistent exercise training effects on myocardial performance of older rats led the current study to evaluate whether swimming training may improve myocardial inotropism in older rats. In addition, the previous information has reported only the influence of running training on aging-related changes in myocardial mechanics in old rodents and the role of swimming training is still uncertain.

To explore potential mechanisms underlying improvement of myocardial contractility, we have investigated the expression of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -regulation as well as sarcomere function proteins in the heart of sedentary and trained old rats. Our data suggest that  $\text{Ca}^{2+}$  transport and myosin heavy chain may be two of the potential mechanisms underlying improvement of myocardial performance with exercise training (3,7).

## Method

### Animals

Male Wistar rats aged 4- and 24-months-old (young and old, respectively) were purchased from the Central Institute on Experimental Animal colony (CEDEME) maintained by Federal University of São Paulo. Animals were housed individually in standard cages with ad libitum access to rat chow and water in a humidity-controlled room with a 12:12 hour light:dark cycle. The 21-months-old group is represented as old-aged because of the median lifespan of ad libitum-fed male Wistar rats in CEDEME. A total of 29 animals were divided into young untrained (YNT;  $n = 10$ ), old untrained (ONT;  $n = 9$ ), and old trained (OTR;  $n = 10$ ) groups. The study complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996), and the experimental protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committee from the Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil (process: 1673020414).

### Exercise Training Protocol

The OTR group was submitted to a swimming training approach in a container (132 cm in diameter and 80 cm deep) filled with tap water warmed to 32°C–34°C by a feedback-controlled electric heating coil (8). The water was maintained in turbulence to provide continuous swimming behavior and not float. Prior aim exercise protocol, rats were preconditioned to the swimming pool for six consecutive days, in which the session of exercise was limited to 15 minutes on the first day and increased by 15 minutes each day. Ultimately, rats swam 6 days a week, once a day, 90 min/day for 6 weeks. The rats swam without the addition of weight to the body or tail; this means that swimming rats were performing within at a moderate intensity [ $\sim 45\%$ – $65\%$  of  $\text{VO}_{2\text{max}}$  (9)].

### Physical Fitness Assessment

The cardiorespiratory fitness was evaluated using a motorized treadmill coupled to a gas analyzer (Panlab, Harvard Bioscience Company,

MA). All animals were initially familiarized with a motor-driven treadmill as previously described by our group (10). The physical fitness was also assessed using an exhaustive swim test (11). The load corresponding to 10% body weight was attached around the waist of each animal, in which animals were individually observed to determine swimming time until exhaustion. Exhaustion was defined as the point when the animal could not swim up to the water surface for 10 seconds.

### Biometric and Histomorphometric Data

Animals were anesthetized with urethane overdose (4.8 g/kg i.p.), and the hearts were rapidly removed and weighed. Then, the LV was separated from the rest of the heart, weighed, and transversally sectioned at the mid-ventricular level. The basal portion was fixed in 10% formalin buffered solution for optical microscopic examination. Myocardial tissue was sectioned at 7  $\mu\text{m}$  thickness and stained with hematoxylin–eosin and picosirius red. Cardiomyocyte nuclear volume and collagen content were assessed at 40 $\times$  magnification using an Olympus image acquisition system [Waltham, MA (12,13)].

### Echocardiography

Animals were anesthetized (i.p.) with ketamine (50 mg/kg) plus xylazine (10 mg/kg) 24 h after the last exercise session, and measurements were performed using a 12 MHz transducer connected to an HP Sonos-5500 echocardiograph [Hewlett-Packard, CA (14)]. The LV diastolic (DA) and systolic (SA) transverse areas were assessed by two-dimensional images in the basal, middle, and apical parasternal transverse planes. The real value was the arithmetic mean of measurements of the three views. The systolic performance was examined by the fractional area change ( $\text{FAC} = \text{DA} - \text{SA}/\text{DA}$ , %). Pulsed Doppler at the LV side of the mitral valve provided the flow velocity curve to analyze the diastolic performance (E and A waves and E/A ratio).

### LV Hemodynamic Study

Twenty-four hours after echocardiographic study, rats were anesthetized (urethane, 1.2 g  $\text{kg}^{-1}$  i.p.) and a 2-F gauge (length 140 cm) Millar catheter-tip micromanometer (model SPR-320, Millar Instruments, Houston, TX) was inserted through the right carotid artery into the LV cavity (15). The follow parameters were recorded: heart rate (HR); systolic pressure (LVSP); end-diastolic pressure (LVEDP); maximum positive ( $+\text{dP}/\text{dt}$ ), and negative ( $-\text{dP}/\text{dt}$ ) time derivatives of the developed pressure. Data were evaluated with AcqKnowledge 3.5.7 software (Biopac Systems, Inc., CA).

### Myocardial Mechanics

Immediately after hemodynamic study, animals received urethane overdose (4.8 g/kg i.p.), and the hearts were quickly removed. Anterior papillary muscles of the LV were isolated and prepared as previously described (8,15). The muscle was attached to an isometric strength transducer (Grass FT-03, Astro-Med, Inc., RI) and stretched to contract isometrically at peak length of its length–tension curve ( $L_{\text{max}}$ ). Then, peak of developed tension (DT) and maximal rate of tension increase ( $+\text{dT}/\text{dt}$ ) and decrease ( $-\text{dT}/\text{dt}$ ) were obtained. Moreover, length–DT curves were derived from data obtained at lengths corresponding to 92%, 94%, 96%, 98%, and 100% of the  $L_{\text{max}}$ . Relative PPC (post-pause contraction) was evaluated using pause durations of 10, 20, and 60 seconds. Relative PPC was expressed as the amplitude of post-pause DT divided by the steady-state DT.

## Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunoblotting

The frozen apical LV portion was homogenized as described in detail elsewhere (13,15), and 30  $\mu$ g of the homogenate was subjected to 7.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to PVDF membranes. The membrane was soaked in a blocking buffer (5% nonfat dry milk, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) for 1 hour at room temperature and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Abcam, Cambridge, MA): rabbit anti-sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a; 1:1,000), rabbit anti- $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX; 1:1,000), L-type calcium channel ( $\text{L-Ca}^{2+}$ ; 1:1,000), ryanodine receptor (RyR; 1:1,000), phospholamban (PLB), phospho-Thr<sub>17</sub>-PLB (PLB-Thr<sub>17</sub>), phospho-Ser<sub>16</sub>-PLB (PLB-Ser<sub>16</sub>; 1:1,000), and anti-myosin heavy chain alpha ( $\alpha$ -MHC; 1:5,000) and beta ( $\beta$ -MHC; 1:5,000). Membranes were washed five times with PBS and incubated for 1 hour with horseradish peroxidase-conjugated (1:2,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Bound antibody was detected using an enhanced chemiluminescence reagent (GE HealthCare, Piscataway, NJ) for 1 minute, and bands were visualized and digitalized using the Amersham Imager 600 system. Quantification of target proteins was normalized for the internal control glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Abcam, Cambridge, MA).

## Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA). Data normality was examined with Shapiro-Wilk test. One-way ANOVA (Newman-Keuls post hoc) was applied to detect differences between groups. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison tests was applied to non-normally distributed data. Statistical significance was set at  $p$ -value of  $\leq 0.05$ . Data are shown as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

## Results

### Swimming Training Reverses Physical Fitness Deficit in Older Animals

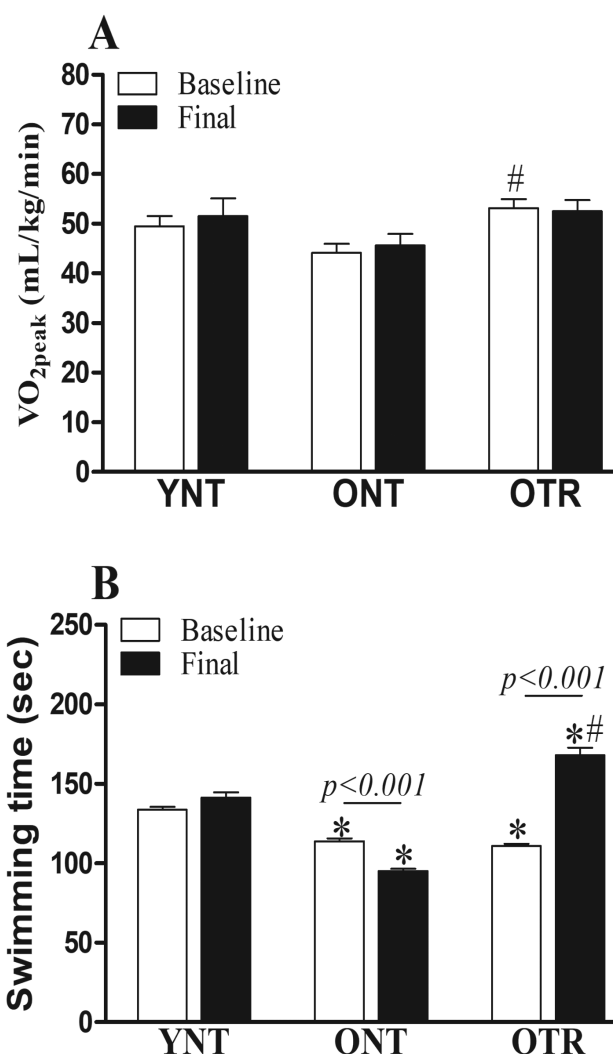
Figure 1A shows  $\text{VO}_{2\text{peak}}$  analysis of treadmill running. It showed that  $\text{VO}_{2\text{peak}}$  was not significantly affected by exercise training in older animals during the follow-up study segment. On the other hand, there was a significant reduction in swimming performance in the ONT group (Figure 1B). Notably, exercise training resulted in marked improvement in swimming performance in the OTR group.

### Swimming Training Induces Myocardial Hypertrophy and Prevents Fibrosis

Rats in the ONT group exhibited a higher ratio of LV weight to body weight compared with rats in the YNT group. Trained animals also showed an additional effect on the heart weight to body weight ratio (Figure 2A and B). Exercise-induced myocardial hypertrophy was confirmed by nuclear cardiomyocyte volume analyses (Figure 2C). Concerning collagen content, older rats showed higher fibrosis depositions in the LV chamber (Figure 2D). The beneficial role of exercise training was observed with no significant differences in myocardial collagen between the YNT and OTR groups.

### Swimming Training Effects on LV Morphology and Performance

Body weight was similar among the groups at the end of the study. Older rats showed suitable LV morphology alterations only



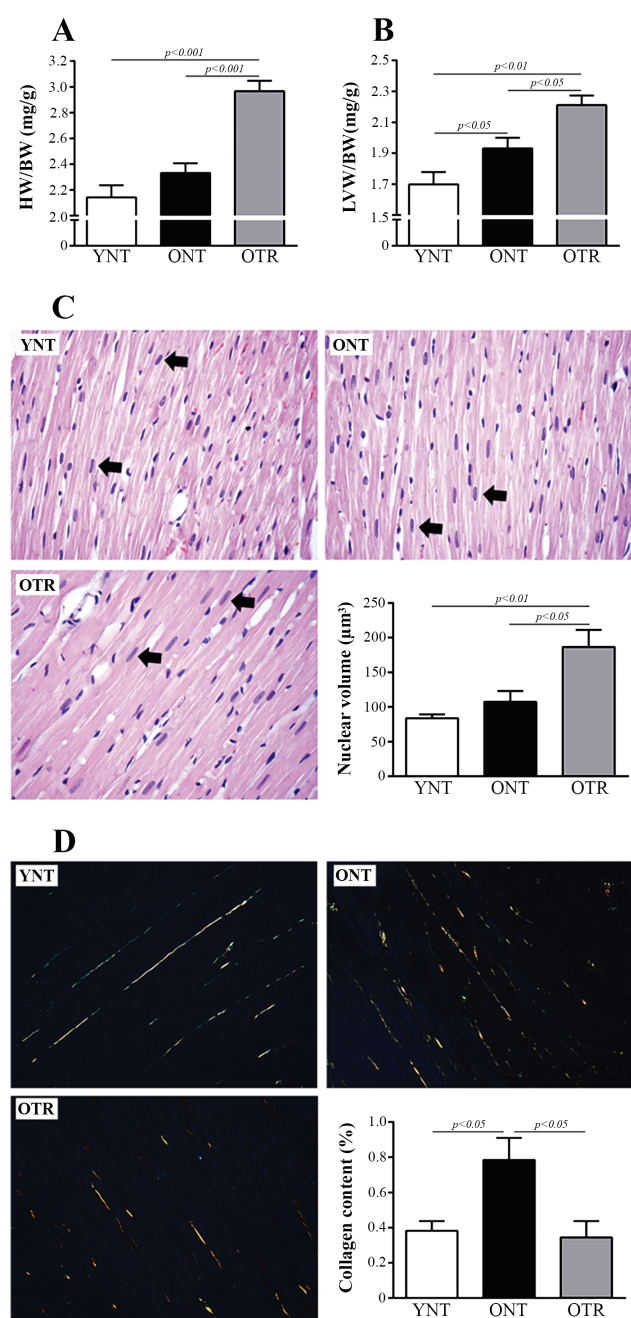
**Figure 1.** Physical fitness of the YNT ( $n = 10$ ), ONT ( $n = 9$ ), and OTR ( $n = 10$ ) groups as a result of 6 weeks of swimming training or similar period for nonexercised rats. (A) Peak oxygen uptake ( $\text{VO}_{2\text{peak}}$ ). (B) Swimming test. Data are shown as mean  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison tests were applied to detect differences between the groups. YNT = young untrained; ONT = old untrained; OTR = old trained. \* $p < .05$  vs YNT group to respective time; # $p < .05$  vs ONT group.

on transthoracic echocardiography (Table 1). In this regard, an increased LV systolic area was the only modification compared to young animals, in which it was not observed upon training. Aging and exercise training had no impact on the LV performance on echocardiographic analysis. Hemodynamic measurements (Table 1) showed that LV end-diastolic pressure was significantly higher in older rats compared with the YNT group. Exercise training did not affect LV end-diastolic pressure.

### Swimming Training Improvements the Myocardial Mechanics in Older Animals

There were remarkable differences in myocardial performance between the three groups. We observed that older rats had myocardial muscle that developed less force than their respective young controls; the result is depicted as a smaller DT and  $+d\text{T}/d\text{t}$  (Figure 3A and B). Moreover,  $-d\text{T}/d\text{t}$  was also significantly lower in older animals (Figure 3C). The myocardial mechanics was significantly affected by exercise training. Indeed, papillary muscles from the





**Figure 2.** Effects of swimming training on cardiac mass (YNT,  $n = 10$ ; ONT,  $n = 9$ ; OTR,  $n = 10$ ) and fibrosis ( $n = 5$  per group) induced by aging. (A) HW/BW heart weight/body weight. (B) LVW/BW, left ventricular weight/body weight. Representative photomicrographs showing (C) nuclear volume and (D) collagen staining in the LV myocardial tissue, respectively (magnification  $\times 40$ ; scale bar:  $250 \mu\text{m}$ ). One-way ANOVA and Newman–Keuls post hoc were applied to detect differences between the groups. Significance level for the comparisons is shown above the bars. HW/BW = heart weight/body weight; LVW/BW = left ventricular weight/body weight; YNT = young untrained; ONT = old untrained; OTR = old trained.

OTR group exhibited similar DT and  $+dT/dt$  data compared with the YNT group, as well as an improved  $-dT/dt$ .

As shown in Figure 3D, the DT was plotted as a dependent of muscle length. The active length–DT relationship from the ONT group was shifted downwards, with a lower slope value of linear

worsened when compared to the other groups. Notably, the slope was preserved in exercise-trained rats. In this way, it is possible to state that for the same variation of muscle length, recruitment of the Frank–Starling mechanism is preserved in the older trained myocardium. In Figure 3E, there are post-rest contraction data that allow indirect evaluation of the SR function (16). In the healthy myocardium of rats, post-rest contraction is potentiated due to additional  $\text{Ca}^{2+}$  accumulated in the SR during the stimulus pause depending on SERCA2 activity and increased fractional  $\text{Ca}^{2+}$  release upon activation. Thus, the post-rest contraction was well evident in the YNT group, which increased with the duration of the pause. However, in the muscles from older groups, post-rest contraction behavior was changed. There was a plateau of the muscle force after the first stimulus pause, in which it was independent of the exercise training action.

### Swimming Training Modulates Expression of $\text{Ca}^{2+}$ -Regulating Proteins and Normalizes Myocardial Isoform Switches

Changes in expression of proteins that modulate calcium handling have been a common finding in the older myocardium (17). In this study, older rats showed a significant decrease in NCX, SERCA2a, PLB-Thr<sub>17</sub>, and PLB-Ser<sub>16</sub> expression (Figure 4). Furthermore, ONT animals exhibited higher L- $\text{Ca}^{2+}$  content. Exercise training attenuated effects of aging on L- $\text{Ca}^{2+}$ , PLB-Thr<sub>17</sub>, and PLB-Ser<sub>16</sub> expression. We also assessed whether older animals could have altered protein expression of  $\alpha$ - and  $\beta$ -MHC (Figure 4I and J). These analyses were carried out because the distribution of  $\alpha$ - and  $\beta$ -MHC showed to be directly correlated with myocardial dysfunction in aged tissue (18). There was no differential expression of  $\alpha$ -MHC between the experimental groups (Figure 4I). However, Figure 4J illustrates that  $\beta$ -MHC expression was upregulated in the ONT group and unaltered in the OTR group. Therefore,  $\beta/\alpha$  ratio was higher in the ONT group (Figure 4K) and preserved in trained animals.

### Discussion

The current study has three main findings. First, swimming training-induced myocardial hypertrophy, and cardiomyocyte growth has been accompanied by a protective exercise effect on the myocardial structure. Thus, an increased interstitial collagen content was not present in trained older rats. Second, swimming training attenuated the effect of aging on several key proteins that modulate cardiomyocyte  $\text{Ca}^{2+}$  handling. A protective effect of exercise was most pronounced on  $\beta$ -MHC expression and  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC ratio, in which swimming training has mitigated increases evoked by aging. Third, older rats did not show substantial LV dysfunction but aging impaired the myocardial inotropism. Swimming training reversed the negative effect of aging, improving myocardial inotropism to a level similar to that of young rats.

As illustrated in Figure 1, improved functional fitness was not identified when considering the  $\text{VO}_{2\text{peak}}$ , which is a gold standard marker to assess exercise tolerance (19). On the other hand, when exercise performance was analyzed using a swimming approach, we identified a minor aerobic resistance in untrained older rats ( $\sim 17\%$ ), while trained older rats showed a marked improvement ( $\sim 50\%$ ). It is difficult to understand the disagreement between  $\text{VO}_{2\text{peak}}$  and exhaustive swim test, but the training modality may have influenced the  $\text{VO}_{2\text{peak}}$  measurement. Koch and colleagues (20) showed that maximal oxygen uptake increased more with aerobic interval training

**Table 1.** Influence of Aging and Exercise Training on LV Morphology and Function

	YNT ( <i>n</i> = 10)	ONT ( <i>n</i> = 9)	OTR ( <i>n</i> = 10)
Body weight (g)	391 ± 13	415 ± 27	427 ± 22
Echocardiography			
HR (bpm/min)	255 ± 12	247 ± 19	240 ± 20
LVDA (cm <sup>2</sup> )	0.49 ± 0.002	0.55 ± 0.02	0.51 ± 0.02
LVDA/BW (cm <sup>2</sup> /g)	0.0012 ± 0.0006	0.0013 ± 0.0006	0.0012 ± 0.0009
LVSA (cm <sup>2</sup> )	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.01*	0.15 ± 0.01
LVSA/BW (cm <sup>2</sup> /g)	0.00030 ± 0.00003	0.00042 ± 0.000027*	0.00035 ± 0.000034
FAC (%)	75 ± 1	68 ± 2	70 ± 3
E wave (cm/s)	0.64 ± 0.04	0.53 ± 0.03	0.62 ± 0.03
A wave (cm/s)	0.35 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.35 ± 0.01
E/A ratio	1.84 ± 0.12	1.8 ± 0.17	1.81 ± 0.13
Hemodynamic			
HR (bpm/min)	349 ± 17	389 ± 4	366 ± 11
LVSP (mmHg)	119 ± 3	123 ± 6	127 ± 5
LVEDP (mmHg)	2.4 ± 0.2	3.7 ± 0.2*	4.7 ± 0.4*
+dP/dt (mmHg/s)	8,101 ± 624	9,340 ± 680	8,175 ± 752
-dP/dt (mmHg/s)	6,603 ± 390	5,811 ± 574	5,926 ± 321

Note: Echocardiographic and hemodynamic analysis of left ventricular (LV) at the end of the study (YNT, *n* = 6; ONT, *n* = 9; OTR, *n* = 9). YNT = young untrained; ONT = old untrained; OTR = old trained; LV = left ventricle; LVDA = LV diastolic area; LVSA = LV systolic area; FAC = fractional area change; E/A ratio = ratio between the E and A waves; HR = heart rate; LVSP = LV systolic pressure; LVEDP = LV end-diastolic pressure; +dP/dt = maximal positive time derivative of developed pressure; -dP/dt = maximal negative derivative of developed pressure; BW = body weight. Data were analyzed with one-way ANOVA and post hoc Newman-Keuls test.

\*Different from the YNT group.

relative to continuous moderate exercise. In addition, the exercise training approach may have influenced our analysis, thereby, since the exercise training was carried out in the pool, the swimming test was more suitable to identify the improvement of physical fitness. Thus, a swimming test can be a useful tool to determine the physical fitness level of aging.

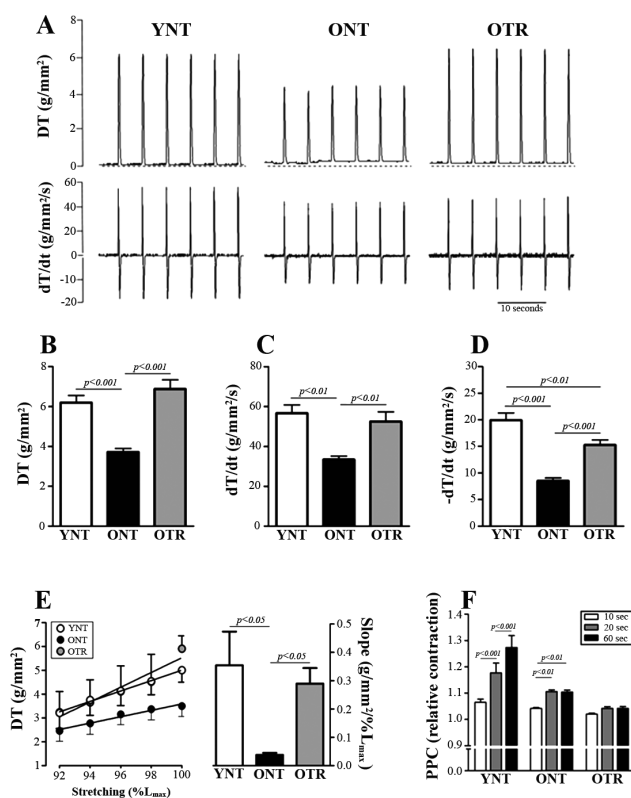
Our results corroborate previous data that demonstrated myocardial hypertrophy in aged rats (21,22), which was more pronounced with exercise. Exercise training also had a significant effect on collagen concentration, where values in older trained rats were like those seen in young rats. Although other researchers showed similar findings, some data have been inconsistent. Thomas and colleagues (23) noted an increase in hydroxyproline LV concentration comparing 10 weeks with 22-months-old rats that was somewhat attenuated in the senescent rats who were submitted to a progressive treadmill incline (15%) at approximately 70% of maximal oxygen uptake (45 min/day; 5 days/week) for 10 weeks. However, Tomanek and colleagues (24) failed to find a significant collagen reduction in 22-months-old rats because of a motor-driven treadmill 6 days per week for a 12-week period. The non-significant findings may be due to species variances, maturational status, or even differences in exercise protocols.

We have applied echocardiography and hemodynamic approaches to evaluate LV performance, and results from these experiments have revealed an only significant change in LVEDP, previous corroborating evidence that cardiac compliance decreases with aging (25,26). It is conceivable that the age-related decline in the compliance is likely a greater myocardial stiffness, and our findings of increased collagen LV concentration show to be a main cause of the altered stiffness in nontrained rats (23,25). However, LVEDP levels reached from 3.7 to 4.7 mmHg in elderly rats, which has been considered similar to the normal range for health young rats (27).

Although LV performance has not been extensively altered in older rats, myocardial performance was worsened as assessed by both DT and +dT/dt on in vitro papillary muscle preparations. Moreover,

aging evoked a downwards shift of resting length-DT curves, suggesting that the Frank-Starling relationship is also worsened (15). Lastly, aging may change the regular post-rest potentiation to post-rest stabilization of force. In fact, as most of the Ca<sup>2+</sup> returns to the SR during rest, its content tends to accumulate with prolonged pause time, also increasing Ca<sup>2+</sup> release and force generation in next activation (16). Hence, post-rest potentiation alterations may be attributed to malfunctioning SR, in which it converges in a relative reduction of free Ca<sup>2+</sup>. Our experiments suggest that impaired SR reuptake function may be due to decreased SERCA2a content and its regulatory proteins (PLB-Thr<sub>17</sub>/Ser<sub>16</sub>). Moreover, altered SERCA2a and PLB-Thr<sub>17</sub>/Ser<sub>16</sub> also helps explain slowed myocardial relaxation (-dT/dt) in older rats. An interesting aspect of this study is the reduced NCX and increased L-Ca<sup>2+</sup> myocardial content, which to our knowledge is a finding described only by few investigations (28). The repercussion of these discoveries of muscle function shown to be clarified, but a first step could be to investigate the impact of altered NCX and L-Ca<sup>2+</sup> on Ca<sup>2+</sup> handling because a prolonged Ca<sup>2+</sup> transients (3) or slower Ca<sup>2+</sup> transient decay arises (17) are commonly reported in older rats. Finally, our findings corroborate that age-related change in contractile proteins is an upright shift of slower  $\beta$ -MHC, which can slow relaxation (17). Moreover, increased  $\beta$ -MHC expression may also partially explain lower +dT/dt of aged papillary muscles. Studies carried out on myofibrillar ATPase activity have reported that the speed with which muscle shortens is correlated with the ATP-hydrolyzing capacity of the myosin (18).

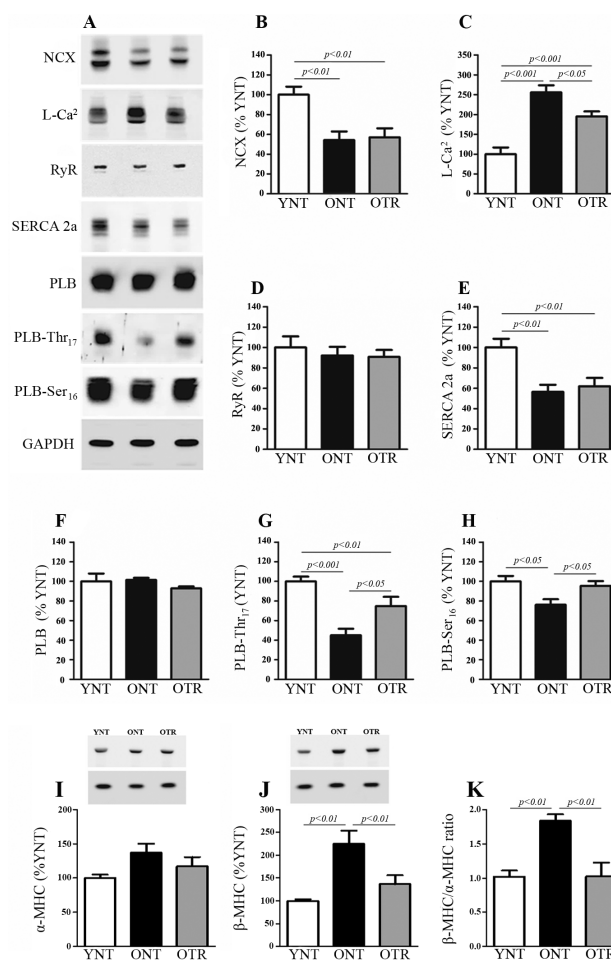
The most important finding of the present study was the effectiveness of swimming training on improvement of myocardial contractility in older rats. Exercise resulted in maintenance of myocardial inotropism and contraction speed as well as improvement of relaxation. Moreover, Frank-Starling mechanism was also preserved in trained aged rats. To our knowledge, previous studies have examined the role of running exercise training in myocardial performance, in which the duration of training has varied between 4 and 20 weeks on a rodent treadmill. These studies have identified benefits (3,4)



**Figure 3.** In vitro myocardial performance of the papillary muscle evaluated at lengths corresponding to 100% of  $L_{max}$  (YNT,  $n = 10$ ; ONT,  $n = 9$ ; OTR,  $n = 10$ ). (A) Typical tracings representing mechanical parameters of the papillary muscle. (B) Peak developed tension (DT). Maximal (C,  $+dT/dt$ ) positive and (D,  $-dT/dt$ ) negative time derivative of DT. (E) Straight lines were fitted to the developed length–tension relationships using linear regression analysis. Mean DT slopes were compared between groups with one-way ANOVA and Newman–Keuls post hoc test was applied to detect differences between the groups, and significance level for comparisons is shown above the bars (right graph). (F) Potentiation of post-rest contractions is evident in young untrained (YNT) rats while post-rest steady-state of force was reported in muscles of older rats with no effect of exercise training. Two-way repeated ANOVA and Bonferroni post hoc test was applied to detect differences between the groups and times. Significance level for comparisons between pause is shown above the bars (right graph). YNT = young untrained; ONT = old untrained; OTR = old trained. \* $p < .05$  vs YNT group for the corresponding pause.

or not (5,6) of exercise training on contractile indices of myocardial performance (eg, longer time-to-peak tension). In our study, an increased rate of contraction ( $+dT/dt$ ) and relaxation ( $-dT/dt$ ) myocardial was accompanied by improved inotropism (DT) in older rats undergoing 6 weeks swimming training. These results suggest that better results for myocardial mechanics can be obtained with a swimming training program compared to running in rats.

The underlying mechanism for the improvement in contractility is said to be multifactorial, including increased myocardial catecholamine stores (4), improvement in metabolic enzyme activity (29) as well as mitochondrial function (30), maintenance of myocyte number because of the anti-apoptotic exercise effect (31), and increase in atrial myosin light chain 1 expression (32). In our study, we have identified other mechanisms that may be involved in the improvement of exercise-induced myocardial performance. Inhibition of age-related changes in collagen content could help to explain the exercise-induced improvement of myocardial relaxation. We also



**Figure 4.** Myocardial protein expression evaluated by immunoblotting (YNT,  $n = 10$ ; ONT,  $n = 9$ ; OTR,  $n = 10$ ). (A) Representative blots for proteins that regulate the  $Ca^{2+}$  handling. The evaluated proteins were (B)  $Na^{+}/Ca^{2+}$  exchanger (NCX), (C) L-type calcium channel ( $L-Ca^{2+}$ ), (D) ryanodine receptor (RyR), (E) sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA 2a), (F) phospholamban (PLB), (G) phospho-Thr17-PLB (PLB-Thr<sub>17</sub>), and (H) phospho-Ser16-PLB (PLB-Ser<sub>16</sub>). Protein expression of  $\alpha$ -MHC and  $\beta$ -MHC isoforms is shown in I and J, respectively. (K)  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC ratio. All values were normalized for levels of GAPDH. One-way ANOVA and Newman–Keuls post hoc test was applied to detect differences between the groups, and significance level for comparisons is shown above the bars. YNT = young untrained; ONT = old untrained; OTR = old trained.

provided evidence that intrinsic cardioprotective benefits in older rats can be associated with changes in several proteins that modulate  $Ca^{2+}$  handling. Maintenance of PLB-Ser<sub>16</sub> levels and improvement of the PLB-Thr<sub>17</sub> content may be associated with functional SERCA2a improvement. These findings may explain an increased calcium transport by the SERCA, in which it shows potential mechanisms underlying the improvement of myocardial performance with exercise training initiated during senescence (3). Notwithstanding, the preserved  $\beta$ -MHC/ $\alpha$ -MHC ratio could be involved in the maintenance of myocardial shortening and relaxation speed as well as conserved Frank–Starling mechanisms in trained older rats.

In summary, swimming training protected age-induced remodeling of myocardial tissue. It includes increased connective tissue and attenuated myocardial performance. Regular exercise also improved key proteins that regulate the  $Ca^{2+}$  handling and sarcomere velocity. It should be noted, however, that in the current design, it cannot be



determined whether the benefits of exercise training are more evident to counteract aging over the longer term, in which exercise could be started in middle-aged animals to avoid adverse myocardial effects noticed in older animals. However, our study indicates that exercise is useful to improve myocardial mechanics when initiated in senescence. Although exercise resulted in improvement of myocardial inotropism associated with attenuation of the effect of aging on proteins that modulate intracellular calcium ( $\text{LCa}^{2+}$ , PLB-Thr<sub>17</sub>, and PLB-Ser<sub>16</sub>), we were unable to directly test whether exercise training exercise modulates cardiomyocyte calcium handling in the older rats.

## Funding

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; 479395/2012–8) and the São Paulo Research Foundation (FAPESP; 15/11028–9 and 13/10619–8).

## Acknowledgments

We thank Editage Translation Company for critical reviewing of English language.

## Conflict of Interest

None declared.

## References

- Floegel TA, Perez GA. An integrative review of physical activity/exercise intervention effects on function and health-related quality of life in older adults with heart failure. *Geriatr Nurs*. 2016;37:340–347. doi:10.1016/j.gerinurse.2016.04.013
- Fujimoto N, Prasad A, Hastings JL, et al. Cardiovascular effects of 1 year of progressive and vigorous exercise training in previously sedentary individuals older than 65 years of age. *Circulation*. 2010;122:1797–1805. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.973784
- Tate CA, Taffet GE, Hudson EK, Blaylock SL, McBride RP, Michael LH. Enhanced calcium uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum in exercise-trained old rats. *Am J Physiol*. 1990;258:H431–H435.
- Gwathmey JK, Slawsky MT, Perreault CL, Briggs GM, Morgan JP, Wei JY. Effect of exercise conditioning on excitation-contraction coupling in aged rats. *J Appl Physiol* (1985). 1990;69:1366–1371.
- Wei JY, Li Y, Lincoln T, Grossman W, Mendelowitz D. Chronic exercise training protects aged cardiac muscle against hypoxia. *J Clin Invest*. 1989;83:778–784. doi:10.1172/JCI113957
- Taffet GE, Michael LA, Tate CA. Exercise training improves lusitropy by isoproterenol in papillary muscles from aged rats. *J Appl Physiol* (1985). 1996;81:1488–1494.
- Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Exercise training improves cardiac function-related gene levels through thyroid hormone receptor signaling in aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1696–H1705. doi:10.1152/ajpheart.00761.2003
- Reis Junior D, Antonio EL, de Franco MF, de Oliveira HA, Tucci PJ, Serra AJ. Association of exercise training with tobacco smoking prevents fibrosis but has adverse impact on myocardial mechanics. *Nicotine Tob Res*. 2016;18:2268–2272. doi:10.1093/ntr/ntw180
- Kregel KC. Resource book for the design of animal exercise protocols. Committee to develop an American physiological society resource book for the design of animal exercise protocols. <http://www.the-aps.org/mm/SciencePolicy/AnimalResearch/Publications/Animal-Exercise-Protocols/book14824.pdf>. Accessed October 16, 2017.
- Guaraldo SA, Serra AJ, Amadio EM, et al. The effect of low-level laser therapy on oxidative stress and functional fitness in aged rats subjected to swimming: an aerobic exercise. *Lasers Med Sci*. 2016;31:833–840. doi:10.1007/s10103-016-1882-2
- Bocalini DS, Carvalho EV, de Sousa AF, Levy RF, Tucci PJ. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after 2 weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109:909–914. doi:10.1007/s00421-010-1406-x
- Serra AJ, Higuchi ML, Ihara SS, et al. Exercise training prevents beta-adrenergic hyperactivity-induced myocardial hypertrophy and lesions. *Eur J Heart Fail*. 2008;10:534–539. doi:10.1016/j.ejheart.2008.03.016
- Silva JA Jr, Santana ET, Manchini MT, et al. Exercise training can prevent cardiac hypertrophy induced by sympathetic hyperactivity with modulation of kallikrein-kinin pathway and angiogenesis. *PLoS One*. 2014;9:e91017. doi:10.1371/journal.pone.0091017
- Antonio EL, Serra AJ, dos Santos AA, et al. Are there gender differences in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats? *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015;30:70–76. doi:10.5935/1678-741.20140093
- Serra AJ, Santos MH, Bocalini DS, et al. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *J Physiol*. 2010;588:2431–2442. doi:10.1113/jphysiol.2010.187310
- Bocalini DS, dos Santos L, Antonio EL, et al. Myocardial remodeling after large infarcts in rat converts post rest-potential in force decay. *Arq Bras Cardiol*. 2012;98:243–251.
- Keller KM, Howlett SE. Sex differences in the biology and pathology of the aging heart. *Can J Cardiol*. 2016;32:1065–1073. doi:10.1016/j.cjca.2016.03.017
- Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43:388–403. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.07.045
- Carlson DJ.  $\text{VO}_{2\text{max}}$ : the gold standard? *Chest*. 1995;108:602–603.
- Koch LG, Britton SL, Wisløff U. A rat model system to study complex disease risks, fitness, aging, and longevity. *Trends Cardiovasc Med*. 2012;22:29–34. doi:10.1016/j.tcm.2012.06.007
- Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol*. 1986;8:1441–1448.
- Alencar AK, da Silva JS, Lin M, et al. Effect of age, estrogen status, and late-life GPER activation on cardiac structure and function in the Fischer344xBrown Norway female rat. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72:152–162. doi:10.1093/gerona/glw045
- Thomas DP, Cotter TA, Li X, McCormick RJ, Gosselin LE. Exercise training attenuates aging-associated increases in collagen and collagen crosslinking of the left but not the right ventricle in the rat. *Eur J Appl Physiol*. 2001;85:164–169. doi:10.1007/s004210100447
- Tomanek RJ, Taunton CA, Liskop KS. Relationship between age, chronic exercise, and connective tissue of the heart. *J Gerontol*. 1972;27:33–38.
- Arbab-Zadeh A, Dijk E, Prasad A, et al. Effect of aging and physical activity on left ventricular compliance. *Circulation*. 2004;110:1799–1805. doi:10.1161/01.CIR.0000142863.71285.74
- Feng W, Xu X, Zhao G, et al. Increased age-related cardiac dysfunction in bradykinin B2 receptor-deficient mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016;71:178–187. doi:10.1093/gerona/glu210
- Saraiva RM, Kanashiro-Takeuchi RM, Antonio EL, Campos O, P J F T, Moisés VA. Rats with high left ventricular end-diastolic pressure can be identified by Doppler echocardiography one week after myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40:1557–1565.
- Howlett SE, Nicholl PA. Density of 1,4-dihydropyridine receptors decreases in the hearts of aging hamsters. *J Mol Cell Cardiol*. 1992;24:885–894.
- Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Aging-induced decrease in the PPAR- $\alpha$  level in hearts is improved by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1750–H1760. doi:10.1152/ajpheart.01051.2001
- Starnes JW, Beyer RE, Edington DW. Myocardial adaptations to endurance exercise in aged rats. *Am J Physiol*. 1983;245:H560–H566.
- Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB J*. 2006;20:791–793. doi:10.1096/fj.05-5116fj
- Chung E, Diffie GM. Moderate intensity, but not high intensity, treadmill exercise training alters power output properties in myocardium from aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67:1178–1187. doi:10.1093/gerona/gls146